(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0059295
(43) 공개일자 2024년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 5/06 (2006.01) *A61K 41/00* (2020.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61N 5/062 (2013.01)
A61K 39/00 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2022-0140380
(22) 출원일자 2022년10월27일
심사청구일자 2022년10월27일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
김광명
서울특별시 성북구 길음로 119, 228동 1501호(길음동, 길음뉴타운)
김태일
경기도 평택시 평택로 17(평택동, 롯데인벤스 스카이)
이주승
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교 자연과학캠퍼스 제2공학관 26304호
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **저출력의 가시광선으로 항종양 면역을 강화하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치 및 이의 작동방법**

(57) 요 약

본 발명은 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치에 관한 것으로서 마이크로 니들 형상의 기판 상에 병렬 연결된 발광 다이오드가 구비된 것으로, 암 조직으로의 직접적인 광원을 제공할 수 있으며, 최적화된 출력값과 파장범위의 광원을 암 조직 내에 제공하여 암에 대한 치료 효능을 현저히 향상시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 41/0057 (2013.01)
A61N 5/0601 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/5152 (2023.05)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61N 2005/0612 (2013.01)
A61N 2005/0652 (2013.01)
A61N 2005/0662 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711173592
과제번호	2022M3H4A1A03067401
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노소재기술개발
연구과제명	외부자극 감응형 나노항암제를 이용한 종양미세환경 면역원성 에디팅 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2022.04.21 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

암 조직 내에 진입 가능한 소정의 폭과 두께를 갖는 마이크로 니들 형상의 지지부;

상기 지지부 상에 형성되는 기판;

상기 기판 상에 소정 간격으로 이격되어 축 방향으로 정렬 배치된 복수의 발광 다이오드가 구비된 광원부;

상기 기판의 일 면에 형성되고, 상기 발광 다이오드와 일 측이 접촉 결합되어 전기적으로 연결되어 전원을 공급하는 전극부;

상기 광원부 상부에 위치하는 절연성 물질로 구성된 코팅부;로 구성된 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마이크로 니들 형상은 외주면을 따라 반원호 형상을 가지는 날카로운 첨두-아치 형상인 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 지지부의 폭은 10 내지 150 ㎛인 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 지지부의 두께는 1 내지 20 ㎛인 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 광원부로부터 발생되는 파장의 출력은 10 내지 40 mW이고, 파장범위는 380 nm 내지 780 nm인 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 기판은 폴리디메틸실록산(PDMS) 또는 폴리이미드(polyimide, PI)인 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 지지부는 PET(polyethyleneterephthalate), PC(polycarbonate), PES(polyethersulfone), PEN(polyethylenapthanate), PSA(Polysiloxane acrylate) 및 PNB(polynorborneen)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

성가 코팅부는 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC), 폴리우레탄(Polyurethane), 우레탄 아크릴레이트(Urethan Acrylate), 이소보르닐 아크릴레이트(Isobornyl Acrylate), 에폭시(Epoxy) 및 PDMS(폴리디메틸실록산, polydimethylsiloxane)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 면역관문억제제와의 병용치료를 통해 암에 대한 면역을 활성화 시키는 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치.

청구항 10

제1항에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 광원부로부터 일정 파장과 출력값을 갖는 광이 대상물에 조사되도록 하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 작동방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 대상물은 면역관문억제제와 광감작제가 존재하는 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 작동방법.

청구항 12

면역관문억제제와 광감작제를 처리하고, 10 내지 40 mW, 380 nm 내지 780 nm파장의 광을 10 내지 100 분 처리하여 사멸화된 암 세포를 유효성분으로 하는 항암백신 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 암은 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 유선암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 비인두 선암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암백신 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 면역관문억제제는 CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) 억제제, PD-1(Programmed cell death protein 1) 억제제, PD-L1(Programmed death-ligand 1) 억제제, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3) 억제제, TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) 억제제, TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) 억제제 및 VISTA(V-domain Ig suppressor of T cell activation) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암백신 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 광감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계(chlorins) 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물 및 5-아미노레불린 에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나

이상인 것을 특징으로 하는 항암백신 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 저출력의 가시광선으로 항종양 면역을 강화할 수 있는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치, 이의 작동방법 및 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치를 이용해 사멸화된 암 세포를 유효성분으로 하는 항암백신용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 광역학치료(PDT)는 광감작제(photosensitizer)가 빛(light)과 산소(oxygen)와의 화학적인 상호반응을 유도하여 일항산소(singlet oxygen)와 자유라디칼(free radical)이 인체내부에서 암세포만 선택적으로 괴사시키는 광 치료법이다. 레이저가 아닌 빛을 이용한 치료법은 수천년 전부터 시작되었으나, 광역학치료는 최근 수십년의 짧은 역사를 가지고 있는 새로운 치료기술이다.

[0003] 광이 조사된 암 세포는 면역원성 세포 사멸(Immunogenic Cell Death, ICD)이 발생하며, CRT(calreticulin) 표면 노출, HMGB1(high mobility group box 1), ATP(adenosine triphosphate), HSP(heat shock proteins) 및 사이토카인(IFN-α and TNF-α)과 같은 여러 손상 관련 분자패턴(DAMP)이 발현된다.

[0004] 광역학치료는 폐암과 식도암, 이외에 후두암, 담도암, 대장암, 방광암, 자궁경부암 등 조직학적으로 모든 범위의 암에 효과가 있는 것으로 알려져 암 치료에 자주 사용되고 있다.

[0005] 그러나 실제 광역학치료를 위해서는 생물학적 조직에 대한 빛의 투과 깊이가 너무 얕기 때문에, 강한 광원을 사용해야하므로 광범위한 조직 손상과 염증 반응을 통해 자기 기능 장애와 같은 부작용이 발생한다. 예를 들어 고강도의 광역학치료는, 암 조직의 심한 염증반응을 유도하고 암 세포에서 면역억제성 사이토카인의 방출 및 조절 T 세포 활성화에 의한 항암 면역 촉진을 억제하여 면역 치료효율을 감소시키는 문제가 있다. 대조적으로 너무 낮은 강도의 광역학치료는, 가시광선이 암 조직의 표면을 5-10 mm^3 이상을 투과하지 못해 불충분한 치료효과만 얻을 수 있다.

[0006] 고령자 암의 증가, 초기 암의 증가, 삶의 질에 대한 의미의 변화, 보다 저침습적인 치료의 선호 등 앞으로의 의료환경의 변화를 생각하면 광역학치료는 이론적으로는 정상조직의 손상없이 암세포만 선택적으로 파괴하는 가장 이상적인 치료방법이나, 현재의 광감작제와 레이저 조사법은 많은 제한점이 있다. 광감작제의 경우 신속하게 종양에 선택적으로 흡수되는 다양한 약제가 개발되고 있고, 수년 내에 보다 효과적인 약제가 사용될 것으로 예측되고 있다. 반면 광원에 대한 연구는 미흡한 실정이므로, 보다 신속하고 선택적이며 부작용이 적도록, 환자의 암에 가장 적절하고 정확한 레이저 에너지 전달을 위한 특별한 설계가 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2002-0060020호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2. 대한민국 공개특허공보 특2001-0106697호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 광역학 치료를 위해 최적의 광강도와 파장범위의 광원을 암 조직 내에 조사할 수 있는 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 작동방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 항암백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 암 조직 내에 진입 가능한 소정의 폭과 두께를 갖는 마이크로 니들 형상의 지지부; 상기 지지부 상에 형성되는 기판; 상기 기판 상에 소정 간격으로 이격되어 축 방향으로 정렬 배치된 복수의 발광 다이오드가 구비된 광원부; 상기 기판의 일 면에 형성되고, 상기 발광 다이오드와 일 측이 접촉 결합되어 전기적으로 연결되어 전원을 공급하는 전극부; 상기 광원부 상부에 위치하는 절연성 물질로 구성된 코팅부;로 구성된 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치를 제공한다.

[0012] 상기 마이크로 니들 형상은 외주면을 따라 반원호 형상을 가지는 날카로운 첨두-아치 형상일 수 있다.

[0013] 상기 지지부의 폭은 10 내지 150 ㎛일 수 있다.

[0014] 상기 지지부의 두께는 1 내지 20 ㎛일 수 있다.

[0015] 상기 광원부로부터 발생되는 파장의 출력은 10 내지 40 mW이고, 파장범위는 380 nm 내지 780 nm일 수 있다.

[0016] 상기 기판은 폴리디메틸실록산(PDMS) 또는 폴리이미드(polyimide, PI)일 수 있다.

[0017] 상기 지지부는 PET(polyethyleneterephthalate), PC(polycarbonate), PES(polyethersulfone), PEN(polyethylenapthanate), PSA(Polysiloxane acrylate) 및 PNB(polynorborneen)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0018] 성가 코팅부는 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC), 폴리우레탄(Polyurethane), 우레탄 아크릴레이트(Urethan Acrylate), 이소보르닐 아크릴레이트(Isobornyl Acrylate), 에폭시(Epoxy) 및 PDMS(폴리디메틸실록산, polydimethylsiloxane)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0019] 상기 면역관문억제제와의 병용치료를 통해 암에 대한 면역을 활성화 시키는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명은 상기 두 번째 과제를 달성하기 위하여, 상기 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 광원부로부터 일정 파장과 출력값을 갖는 광이 대상물에 조사되도록 하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 작동방법을 제공한다.

[0021] 상기 대상물은 면역관문억제제와 광감작제가 존재하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명은 상기 세 번째 과제를 달성하기 위하여, 면역관문억제제와 광감작제를 처리하고, 10 내지 40 mW, 380 nm 내지 780 nm파장의 광을 10 내지 100 분 처리하여 사멸화된 암 세포를 유효성분으로 하는 항암백신 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 암은 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 유선암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 비인두 선암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0024] 상기 면역관문억제제는 CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) 억제제, PD-1(Programmed cell death protein 1) 억제제, PD-L1(Programmed death-ligand 1) 억제제, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3) 억제제, TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) 억제제, TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) 억제제 및 VISTA(V-domain Ig suppressor of T cell activation) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0025] 상기 광감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계(chlorins) 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물 및 5-아미노레불린 에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 마이크로-발광 다이오드 장치는 마이크로 니들 형상의 기판 상에 병렬 연결된 발광 다이오드가 구비된 것으로, 암 조직으로의 직접적인 광원을 제공할 수 있으며, 최적화된 출력값과 파장범위의 광원을 암 조직

내에 제공하여 암에 대한 치료 효능을 현저히 향상시킬 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 마이크로-발광 다이오드 장치는 접근 가능한 신체의 모든 부위에서의 암 치료에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 암에 대한 면역을 형성하여 암의 재발을 억제할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 마이크로-발광 다이오드 장치로 처리된 사멸화된 암 세포는 암에 대한 우수한 면역을 유도하여 암에 대한 수지상 세포의 식작용을 현저히 촉진하는 암 면역 유도효과를 대폭 향상시킬 수 있으므로, 암에 대한 백신 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 제1예에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 사시도이다.

도 2a는 본 발명의 제1예에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 체결 후 상태를 도시한 개략 측면도이다.

도 2b는 본 발명의 제1예에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 작동예이다.

도 3은 제1예의 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 제조과정을 나타낸 도면이다.

도 4는 실시예 1 내지 3 및 비교예로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 SEM 이미지이다.

도 5는 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 입력전력(input power)에 따른 광출력 결과 그래프이다.

도 6은 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치를 VPF에 조사한 후, ROS의 생성정도를 측정하여 나타낸 결과 그래프이다.

도 7은 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 생체 적합성을 평가한 결과 그래프이다.

도 8은 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치를 종양 조직에 이식하고, 입력전력에 따라 광학 현미경으로 촬영한 이미지이다.

도 9는 50mW의 전력이 인가된 실시예 1 내지 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 이식한 암 동물모델의 사진(좌측)과, 적외선 열화상 카메라 이미지(중앙) 및 인가시간에 따른 암 동물모델의 체온 변화를 나타낸 그래프(우측)이다.

도 10은 배양시간별(0, 1, 6, 24 시간) VPF로 처리된 CT26 세포에 대한 공초점 형광 이미지이다.

도 11은 3 시간 동안 VPF 처리된 CT26 세포에 대한 공초점 형광 이미지이다.

도 12는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 공초점 형광 이미지이다.

도 13은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 세포 생존율을 분석하여 나타낸 그래프이다.

도 14는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 Live/Dead 분석결과이다.

도 15 및 도 16은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 Annexin V/PI 분석 그래프이다.

도 17은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 CRT 발현 그래프이다.

도 18은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 CRT 발현을 분석한 형광 영상(a)과 유세포 분석 그래프(b)이다.

도 19는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포에서의 HMGB1, ATP 및 HSP70 발현 그래프이다.

도 20은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포에서의 HMGB1 및 HSP70 발현을 분석한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 21 및 도 22는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포와 공동 배양한 BMDC에서 발현된 성숙 수지상세포($CD11c^{+}CD40^{+}CD86^{+}$)를 유세포 분석기로 측정하여 분석한 결과 그래프이다.

도 23은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 PHrodo 표지된 CT26 세포와 CMFDA로 표지된 BMDM를 공

동배양한 후, 공초점 현미경으로 촬영한 형광 사진과 식작용 정도를 분석한 그래프이다.

도 24는 VPF로 3시간동안 처리 된 암 동물모델의 암 조직의 형광 사진(우측)과, 시간에 따라 촬영한 비침습적 NIRF 사진(좌측)이다.

도 25는 OFF군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4에 대한 광학 이미지이다.

도 26은 시간에 따른 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4로부터 암 부피변화를 나타낸 그래프와 사진 및 암퇴화율(CR)을 나타낸 그래프이다.

도 27은 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 부피를 육안으로 비교하기 위해 촬영한 사진이다.

도 28은 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4로부터 암 조직을 회수하고, 이를 TUNEL로 염색한 형광 사진이다.

도 29는 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4로부터 암 조직을 회수하고, 이를 H&E 염색한 형광 사진이다.

도 30a는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 표면 CRT 발현된 암 세포($CD45^{-}CRT^{+}$)에 대한 유세포 분석 결과이다.

도 30b는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 세포로부터 방출된 HMGB1에 대한 그래프이다.

도 30c는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 cytotoxic T lymphocytes(CTLs;CD45+CD3+CD8)과 성숙 수지상세포(CD11c+CD40+CD86+)에 대한 유세포 분석 결과이다.

도 30d는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 IFN-τ에 대한 유세포 분석 결과이다.

도 30e는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 조절 T lymphocytes(Tregs;CD3+CD4+CD5+)에 대한 유세포 분석 결과이다.

도 30f는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직을 항-CD8 또는 항-CD25로 염색한 형광 사진이다.

도 30g는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직 상등액에서 IL-10의 발현량을 측정한 그래프이다.

도 31은 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직 상등액으로부터 HMGB1을 측정한 결과이다.

도 32a는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 cytotoxic T lymphocytes(CTLs;CD45+CD3+CD8)와 성숙 수지상세포(CD11c+CD40+CD86+)에 대한 유세포 분석결과이다.

도 32b는 암 조직에서 조절 T lymphocytes(Tregs;CD3+CD4+CD5+)에 대한 유세포 분석 결과이다.

도 33은 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 암부피 변화를 촬영한 사진이다.

도 34는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 14일 째 정상조직의 손성여부를 조직학적으로 확인한 결과이다.

도 35a는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 암 부피를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 35b는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 14일 째 암 조직을 TUNEL로 염색한 형광 사진이다.

도 35c는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 체중변화를 나타낸 그래프이다.

도 35d는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 생존율을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 35e 및 도 35f는 CR 상태의 실험군 6으로부터 $CD8^{+}$ 효과기/효과기 기억 T 세포($CD3^{+}CD8^{+}CD44^{+}CD62L^{Low}$)를 유세포 분석한 결과이다.

도 35g는 CR 상태의 실험군 6에 CT26 세포를 재접종한 후 암 성장을 시간별로 확인한 결과이다.

도 35h는 CR 상태의 실험군 6에 CT26 세포를 재접종한 후 15일째 혈청을 회수하여, IFN-τ와 IL-6 발현양을 분석한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0031] 본 명세서에서 서술되는 용어의 의미는 다음과 같이 이해되어야 할 것이다.

[0032] 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 정의하지 않는 한 복수의 표현을 포함하는 것으로 이해되어야 하고, "제 1", "제 2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위한 것으로, 이들 용어들에 의해 권리범위가 한정되어서는 아니 된다. "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 하나 또는 그 이상의 다른 특징이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. "적어도 하나"의 용어는 하나 이상의 관련 항목으로부터 제시 가능한 모든 조합을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, "제 1 항목, 제 2 항목 및 제 3 항목 중에서 적어도 하나"의 의미는 제 1 항목, 제 2 항목 또는 제 3 항목 각각 뿐만 아니라 제 1 항목, 제 2 항목 및 제 3 항목 중에서 2개 이상으로부터 제시될 수 있는 모든 항목의 조합을 의미한다. "상에"라는 용어는 어떤 구성이 다른 구성의 바로 상면에 형성되는 경우 뿐만 아니라 이들 구성들 사이에 제3의 구성이 개재되는 경우까지 포함하는 것을 의미한다.

[0033] 이하에서는 본 발명에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 바람직한 예를 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 각 도면의 구성요소들에 참조부호를 부가함에 있어서, 동일한 구성요소들에 대해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 부호를 가질 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략할 수 있다.

[0034] <제1예>

[0035] 도 1은 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 평면도이고, 도 2a는 본 발명의 제1예에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 사시도이며, 도 2b는 본 발명의 제1예에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 체결 후 상태를 도시한 개략 측면도이다.

[0036] 도 1에 도시된 바와 같이, 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)는 마이크로 니들 형상의 지지부(110); 상기 지지부(110) 상에 형성되는 기판(120); 상기 기판(120) 상에 소정 간격으로 이격되어 축 방향으로 정렬 배치된 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)가 구비된 광원부(130); 상기 기판(120)의 일 면에 형성되고, 상기 발광 다이오드(131)와 일 측이 접촉 결합되어 전기적으로 연결되어 전원을 공급하는 전극부(140); 상기 광원부(130) 상부에 위치하는 절연성 물질로 구성된 코팅부(150);를 포함한다.

[0037] 본 발명에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치는 암 조직 내에 이식함으로써, 암 조직에 직접적으로 광을 조사할 수 있을 뿐만 아니라, 종래 광역학 치료에서의 강한 광원이 아닌 반복실험을 통해 확인한 출력 및 파장범위의 가시광선을 제공하여, 기존 광역학 치료시 제공할 수 없었던 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있다.

[0038] 특히 본 발명에 따른 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치는 광감작제 외에 면역관문억제제와의 병용치료를 통해 완치가 어려운 암 질환에 대한 완전한 치료 효과와 더불어 암에 대한 면역을 형성함으로써, 암이 재발하거나 전이되더라도 스스로 암을 치료하는 암 예방 효과까지 얻을 수 있다.

[0039] 상술한 광역학 암치료 효과를 얻기 위해서는 파장대와 광세기 선택이 가장 중요하다. 광세기가 상기 범위를 벗어나면 암 면역이 아닌 정상조직에 대한 부작용이 나타나 오히려 항암 효과가 저하되는 문제가 발생한다. 본 발명에서 광파장과 입력전력의 선택기준은 암 조직의 투과 깊이는 1 내지 10 mm이고, 광감작제는 버테포르핀(verteporfin)을 사용하였으나, 암치료에 사용되는 광감작제라면 특별히 제한되지 않고 모두 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 광감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계(chlorins) 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물 및 5-아미노레불린 에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 포르피린계(phorphyrins) 화합물 또는 클로린계(chlorins) 화합물을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 광감작제는 TMPyP, TPP, HPPH, verteporfin 및 chlorin e6 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0041] 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)는 마이크로 니들 형태이고, 상기 마이크로 니들 형상은 외주면을 따라 반원호 형상을 가지는 날카로운 첨두-아치 형상인 것을 특징으로 한다.

[0042] 상기 지지부(110)는 암 조직 내에 진입 가능한 소정의 폭과 두께를 갖는 마이크로 니들 형상으로, 이의 폭은 10 내지 150 μm이며, 전체 길이는 암 조직의 크기에 따라 적절히 조절될 수 있으나, 바람직하게는 0.1 내지 100 cm, 0.1 내지 50 cm, 0.1 내지 30 cm, 0.1 내지 10 cm, 바람직하게는 0.3 내지 10 cm일 수 있다. 상기 지지부(110)의 두께는 1 내지 20 μm인 것을 특징으로 한다.

[0043] 기판(120)은 지지부(110) 상에 형성되고, 발광 다이오드(130)가 장착되는 것으로서, 글래스 기판, 플라스틱기판, 및 신축성 기판 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 상기 신축성 기판으로, 열경화성 폴리머를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 폴리디메틸실록산(polydimethylsilioxane, PDMS), 실리콘 고무, 폴리메틸메타크릴레이트(polymethyl methacrylate, PMMA), 폴리우레탄(polyurethane, PU), 폴리에스터(polyester), 폴리이미드(polyimide, PI), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 에폭시 수지(epoxy resin) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 폴리디메틸실록산(PDMS) 또는 폴리이미드(polyimide, PI)를 이용할 수 있다. 또한, 상기 열경화성 폴리머에 다양한 특성을 부가하기 위한 첨가제 또는 촉매가 포함될 수 있다.

[0044] 상기 첨가제는 실리카, 나노탄소, 금속 입자, 금속산화물 입자 등의 강도 부여제일 수 있으며, 예를 들어, 이산화규소(실리카), 탄소나노튜브, 카본 블랙, 활성 탄소, 탄소 섬유, 흑연, 산화티타늄, 산화납, 텅스텐, 산화철, 산화구리, 산화아연 및 알루미나로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 이에 따라, 폴리머 구조체의 강도를 향상시켜 생체 내 암조직으로의 이식이 가능할 정도의 내구성을 확보할 수 있다.

[0045] 상기 기판(120)은 다수의 발광 다이오드(130)를 장착하고 이에 외부 전원을 인가하기 위해 소정의 배선이 형성되어 있으며, 배선에 의해 다수의 발광 다이오드는 서로 전기적으로 연결될 수 있다.

[0046] 상기 기판(120)의 배면에는 지지부(110)가 위치하며, 상기 지지부(110)는 상기 기판(120)의 형상을 유지시키는 역할을 한다. 상기 지지부(110)는 상기 기판보다 낮은 유연성을 갖는 고분자 수지 재질, 예를 들어 PET(polyethyleneterephthalate), PC(polycarbonate), PES(polyethersulfone), PEN(polyethylenapthanate), PSA(Polysiloxane acrylate) 및 PNB(polynorborneen) 중 어느 하나의 재질로 이루어질 수 있다.

[0047] 상기 광원부(130)는 기판(120) 상에 소정 간격으로 이격되어 축 방향으로 정렬 배치된 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)가 구비된다. 상기 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)는 일정한 규칙으로 대응되게 다수 배열 형성되는 것이 바람직하나, 광원의 조사 및/또는 광감작제로부터 ROS 생성효율이 우수하다면 어떠한 형태로 배열하여도 무방하다.

[0048] 상기 광원부(130)에서 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)는 상기 기판(120) 상에 OCA(Optical Clear Adhesive) 또는 ACA(Anisotropically Conductive Adhesive)와 같은 투명 접착제를 사용하여 부착된다.

[0049] 상기 광원부(130)는 일 측에 연결된 전극부(140)를 통해 공급되는 입력전력에 따른 발광을 통해 가시광선을 출력할 수 있다. 상기 관원부(130)의 파장범위는 가시광선 영역의 파장이라면 특별히 제한되지 않으나, 가시광선 영역의 파장(380 nm 내지 780 nm)이라면 바람직하며, 보다 바람직하게는 610 내지 760 nm의 적색 가시광선일 수 있다.[---확인하여 주시기 바랍니다---]

[0050] 상기 광원부(130)로부터 발생되는 출력값은 10 내지 40 mW의 범위가 적용되는 것을 특징으로 한다. 상기 파장범위와 출력값은 후술하는 실험을 통해 치료효과가 검증된 것으로, 상기 광원부(130)의 특정 파장범위는 치료효과를 갖는 것으로, 출력값 10 mW 이하 및 40 mW 이상인 것과는 명확히 그 효과가 구별된다.

[0051] 상기 광원부(130)는 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)로부터 출력값이 10 내지 40 mW, 바람직하게는 25 mW 범위로 항시 유지되도록 구성하는 것이 바람직하다. 이는 본 발명의 후술하는 실험에 의해 발광 다이오드의 출력이 상기 범위를 만족할 경우 최적의 효능을 발휘하는 것으로 밝혀졌기 때문이다.

[0052] 상기 전극부(140)는 상기 기판(120)의 일 면에 형성되고, 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)와 일 측이 접촉결합되어 전기적으로 연결되어 외부로부터 인가되는 전원을 연결하기 위한 것으로, 일정한 폭과 두께를 가지도록 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)와 일 측이 접촉되어 기판(120) 상에 마련되고, 상기 전극부(140)의 양 끝단은 전원에 전기적으로 연결된다.

[0053] 상기 전원은 광원부(130)와의 전기적인 연결을 통해 동작전원을 제공하는 것으로, 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)의 후면에 AC 220V의 전원을 입력하는 전원입력부로부터 인가되거나, 상기 기판 내측에 구비된 배터리(170)로부터 인가될 수 있다. 상기 전원에는 내부장치의 이상으로 과도한 전류가 흐를 경우

장비를 보호하기 위한 휴즈(미도시)가 포함되어 있다.

[0054] 본 발명의 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)에는 상기 전원의 온(on)/(off)를 제어할 수 있는 스위칭 수단이 연결되어 있거나 더 포함될 수 있다. 바람직하게, 상기의 스위칭 수단은 자력을 이용한 방법 또는 무선 신호를 이용한 방법 등이 적용될 수 있으며, 이와 같은 비접촉방식을 이용한 다양한 스위칭 방법은 이미 공지된 방법이 적용된다.

[0055] 본 발명의 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)는 낮은 전원을 인가하여 광을 조사하기 때문에 생체 온도(35 ℃) 이상으로 올라가지 않으므로 냉각팬과 같은 장치를 생략할 수 있으므로, 부피가 작고 무게가 가벼워 사용이 용이하고 휴대성이 우수하다.

[0056] 상기 전극부(140)는 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)를 서로 병렬 연결함으로써, 허용오차 범위 내에서 서로 동일한 전류가 공급될 수 있다.

[0057] 상기 전극부(140)는 상기 기판(120)의 외측벽(121)으로부터 일정한 거리(D1) 만큼 이격되는 것이 바람직한데, 상기 이격거리(D1)는 0.1 내지 1 ㎛일 수 있다.

[0058] 상기 전극부(140)는 코팅부(150)에 의해 밀봉되는데, 상기 코팅부(150)는 상기 기판(120) 상에 마련된 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)를 제외한 나머지 기판(120)의 상부를 덮는다. 이러한 코팅부(150)는 생체 적합하고 투명한 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC), 폴리우레탄(Polyurethane), 우레탄 아크릴레이트(Urethan Acrylate), 이소보르닐 아크릴레이트(Isobornyl Acrylate), 에폭시(Epoxy) 및 PDMS(폴리디메틸실록산, polydimethylsiloxane)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0059] 상기 코팅부(150)는 기판(120), 즉 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)를 제외한 기판(120)의 상면에 부착됨으로써 광원부(130)와 전극부(140) 및 이들의 접합부를 보호하는 역할을 한다.

[0060] 또한 상기 코팅부(150)는 상기 기판(120)과 상기 광원부(130) 및 전극부(140) 간의 접착력을 개선하여 상기 광원부(130)와 상기 전극부(140)의 연결 부위로 침투하는 수분 또는 습기를 차단함으로써 생체내로 이식될 경우 생체 적합성을 확보하여 염증 반응 등의 부작용을 방지할 수 있다.

[0061] 본 발명의 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)에서 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)가 구비된 광원부(130)가 형성된 기판(120)과 지지부(110) 및 코팅부(150)를 포함하는 일단이 외주면을 따라 반원호 형상을 가지는 날카로운 첨두-아치 형상을 보유하도록 하여 암 조직에 찔렀을 때 쉽게 이식될 수 있도록 함으로써, 광 치료 요법 진행시 국소적인 치료 영역에 대한 저출력의 광을 조사, 집중적인 광조사 진행이 필요한 영역에 보다 적합한 장치이다.

[0062] 본 발명에서 '암 또는 종양'은 cancer 또는 tumor와 동일한 의미를 가지며, 구체적으로 조직 내에서 질서를 무시하고 무제한 증식하는 미분화 세포로 구성된 종괴(腫塊) 또는 종양을 형성하는 병을 의미하며, 궁극적으로는 주위의 정상조직이나 기관을 침윤하여 파괴시키고 원발병소(原發病巢)에서 개체의 어떤 기관이로든 전이하여 새로운 성장 장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환군을 총칭한다.

[0063] 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 원발성암 또는 전이암일 수 있으며, 특정 유전자가 돌연변이된 암일 수도 있다. 돌연변이 암은 KRAS 돌연변이 암일 수 있다.

[0064] 상기 암은 뇌암, 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 혈액암, 유방암, 유선암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 항문암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 비인두암, 갑상선암, 골암, 담낭암, 임파종, 골육종, 구강암, 기관지암, 후두암, 피부암, 편평상피세포암, 부갑상선암, 요관암, 신장암, 전립선암 및 요로상피암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명에서 '대상체'란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 도 3은 본 발명의 광역학 치료를 위한 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)의 지지부(110)의 제조방법의 순서를 도시한 순서도이다.

[0067] 본 발명의 광역학 치료를 위한 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 제조방법은 지지부(110) 제조단계, 전극부(140) 패턴화 단계, 광원부(130) 적층 단계, 코팅 단계 및 일체화 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0068] 먼저, 지지부(110) 제조단계는 기판의 형상을 유지하는 지지부(110)를 제조하는 것으로, 유리기판의 양측 말단에 2개의 스페이서를 각각 이격되게 배치하여 고정하고, 첨두 아치 형상의 마이크로 니들 구조의 패턴 모양의 홈을 갖는 포토마스크를 스페이서 상에 위치시킨 후, 상기 포토마스크의 상단부로부터 모세관 현상에 의해 고분자 수지 전구체 조성물을 토출시켜, 상기 홈에 주입한다. 상기 포토마스크를 통해 UV를 조사하면 경화되어 마이크로 니들 형상의 지지부(110)가 제조된다.

[0069] 다음, 유리기판 상에 포지티브 포토레지스트에 의한 리프트오프를 위한 희생층을 소정 두께로 코팅한다. 포토레지스트 코팅은 스핀 코팅이 이용될 수 있다.

[0070] 상기 희생층을 소정 온도로 열처리하고, 상기 희생층 상에 열경화성 고분자 수지 조성물을 소정 두께로 증착하여 기판(120)을 형성한다. 이때 스핀 코팅을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 기판을 100 내지 300 ℃에서 1 내지 240분 동안 열처리한다.

[0071] 상기 기판 상측에 금속으로 이루어지는 전극 패턴을 갖는 전극부(140)를 형성한다. 상기 전극부(140)는 습식에칭패턴 형성을 위한 포토레지스트 패턴을 형성하고, 포토레지스트가 제거된 부위를 따라 상기 습식에칭을 통해 형성되었다.

[0072] 상기 전극부(140)가 형성된 기판(120) 상에 전사 인쇄 공정을 사용하여 접착제를 도포하고, 상기 접착제에 복수의 발광 다이오드(131, 132, 133, 134)를 위치시켜 고정하게 된다. 상기 접착제로는 열에 의해 경화되는 열 접착제나 자외선에 의해 경화되는 자외선 접착제를 사용할 수 있으나, OCA(Optical Clear Adhesive) 또는 ACA(Anisotropically Conductive Adhesive)와 같은 투명 접착제를 사용하는 것이 바람직하다.

[0073] 상기 기판(120)의 상면에 에폭시 수지 조성물을 코팅하여 코팅부(150)를 형성한다.

[0074] 상기 코팅부(150) 까지 모두 구비된 기판(120)의 표면에 식각마스크를 배치하여 식각마스크로 커버링된 보호영역과 오픈된 개방영역으로 구분되는 패턴을 형성한다. 이후 식각공정을 수행하여, 식각마스크의 개방영역은 식각되고, 식각마스크의 보호영역은 식각되지 않은 형태의 입체 패턴을 형성한다. 상기 식각마스크 패턴은 지지부(110)의 마이크로 니들 형상일 수 있다. 상기 식각 공정은 통상의 기술자에게 잘 알려진 식각장비를 이용하여 수행될 수 있다.

[0075] 상기 식각공정 이후에는 플라즈마 표면처리를 통해 희생층을 제거함으로써, 상기 기판(120)을 유리기판으로부터 분리한다.

[0076] 상기 지지부(110)와 상기 기판(120)을 일체화한다. 상기 지지부(110) 상에 상기 기판(120)을 적층하고 소정의 외력을 가해 가압함으로써, 일체화할 수 있다. 이때, 상기 지지부(110)의 상부 표면과 광원부(130)가 존재하지 않는 기판(120)의 타면이 접촉된 이후, 일체화되도록 진행한다.

[0077] 상기 지지부(110)와 상기 기판(120) 사이의 이격 공간이 발생하지 않도록 상기 지지부(110) 상에 접착제를 도포하여 진행될 수 있다. 상기 접착제는 OCA(Optical Clear Adhesive) 또는 ACA(Anisotropically Conductive Adhesive)와 같은 투명 접착제가 사용될 수 있다. 상기 접착제의 경화를 통해 상기 지지부(110)와 기판(120)의 견고하게 고정될 수 있다.

[0078] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)의 광원부(130)로부터 일정 파장과 출력값을 갖는 광이 대상물에 조사되도록 하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치의 작동방법에 관한 것이다.

[0079] 본 발명의 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)는 광원부(130)가 구비된 기판(120)의 전단을 암 조직으로 삽입하는데, 암 조직 내로 삽입을 용이하기 위해 상기 기판(120)은 배면에 지지부(110)가 위치하고, 상기 지지부(110)에 의해 마이크로 니들 형상이 유지되며, 이는 외주면을 따라 반원호 형상을 가지는 날카로운 첨두-아치 형상이므로, 암 조직 삽입에 용이하다. 또한 상기 기판(120)은 지지부(110)가 배면에 위치하므로 저항을 받아도 기판(120)과 지지부(110)가 생체 내 삽입 가능한 경도를 가지므로 굽어지거나 손상되지 않고, 암조직 내로 삽입 및 이식 가능하다.

[0080] 본 발명의 도 2b 및 도 8을 참고하여 설명하면, 도 8은 본 발명의 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)를 암 조직 내에 삽입한 후 광을 조사한 작동예를 촬영한 것으로, 본 발명의 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(100)의 광원부(130)가 구비된 기판(120)의 전단을 암 조직 속으로 삽입하면, 지지부(110)가 가이드 구조물의 역할을 수행하여 삽입시 휘어지거나 구부러지지 않게 그 상태로 조직 내에 삽입될

수 있도록 하여, 광원부(130)가 암 조직 내에 자리잡을 수 있게 한다.

[0081] 광원부(130)는 기판(120)의 일 단에 복수의 발광 다이오드(131, 132 ...)가 구비되어 형성되며, 광원을 조사한다. 배경기술에서 언급한 바와 같이 종래 광역학 치료를 위한 광원 조사 방법은 암 조직 외부에서 내부 방향으로 광을 조사하므로, 암 조직의 두께나 크기에 따라 가시광선이 투과하지 못하는 경우가 있어 강한 광원(50 mW 이상)을 사용하는데, 이 경우 광범위한 조직 손상과 염증 반응을 야기하며 암 세포사멸보다 암세포 괴사(necrosis)를 유의적으로 높게 야기하여 ICD 유도 효과가 낮은 문제가 있었다. 그러나 본 발명은 광원부(130)가 암 조직을 뚫고 내부에 위치함으로써 저출력의 광원을 국소 부위에 집중적으로 제공할 수 있고, 암세포의 괴사보다 암세포사멸을 유도함으로써 암세포로부터 CRT와 포스파티딜 세린을 발현하여 수지상세포의 식작용을 촉진하는 암 면역 유도 효과를 대폭 향상시킬 수 있다.

[0082] 광원부(130)에 전극부(140)를 통해 전원이 인가되면, 일정 파장과 출력값을 갖는 광을 대상물에 조사되도록 할 수 있다. 광원부(130)의 작동 여부는 육안을 통해 확인할 수 있으며, 10 내지 100분 동안 처리할 수 있다.

[0083] 상기 대상물은 광의 조사가 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 바람직하게 상기 대상물은 광역학 치료를 위해 광감작제가 투여된 대상일 수 있으며, 광감작제가 축적된 암 조직일 수 있다.

[0084] 상기 대상물은 면역관문억제제와 광감작제가 동시에 존재하는 것일 수 있는데, 이는 암의 완전한 사멸과 동시에 암에 대한 특이적 면역을 형성시켜 암이 다시 재발하거나 전이되지 못하도록 하는 현저한 치료효과를 얻을 수 있기 때문이다.

[0085] 즉, 시술자는 암 조직의 위치를 파악하고, 상기 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(10)를 삽입한 후, 전원을 인가하여 가시광선을 발산함으로써 간편히 시술을 수행할 수 있다.

[0086] 본 발명의 또 다른 측면은 면역관문억제제와 광감작제를 처리하고, 10 내지 40 mW, 380 nm 내지 780 nm파장의 광을 10 내지 100 분 처리하여 사멸화된 암 세포를 유효성분으로 하는 항암백신 조성물에 관한 것이다.

[0087] 상기 사멸화된 암 세포는 암 세포(cancer cell)라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 예를 들어 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 유선암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 비인두 선암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 유래된 암세포라면 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 대장암 세포일 수 있으며, 바람직하게 CT26 세포 등이 있다.

[0088] 먼저, 암세포는 면역관문억제제와 광감작제를 처리하는데, 상기 면역관문억제제는 CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) 억제제, PD-1(Programmed cell death protein 1) 억제제, PD-L1(Programmed death-ligand 1) 억제제, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3) 억제제, TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) 억제제, TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) 억제제 및 VISTA(V-domain Ig suppressor of T cell activation) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 PD-L1(Programmed death-ligand 1) 억제제일 수 있으며, 보다 바람직하게는 항 PD-L1 항체일 수 있다.

[0089] 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 두발루맙(durvalumab), 엔바폴리맙(envafolimab), 코시벨리맙(cosibelimab), AUNP12, CA-170, BMS-936559, CS-1001, SHR-1316 (HTI-1088), CBT-502 (TQB-1450) 및 BGB-A333로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 상기 광감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계(chlorins) 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물 및 5-아미노레불린 에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 포르피린계(phorphyrins) 화합물 또는 클로린계(chlorins) 화합물을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 광감작제는 TMPyP, TPP, HPPH, verteporfin 및 chlorin e6 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0091] 상기 암세포는 면역관문억제제와 광감작제가 처리되고 3 시간이 지난 후, 10 내지 40 mW, 380 nm 내지 780 nm파

장의 광을 10 내지 100분 동안 조사하는 것이 바람직하며, 25 mW, 380 nm 내지 780 nm파장의 광을 50 내지 100분동안 조사하는 것이 더욱 바람직하다.

[0092] 상기 조건으로 사멸화된 암 세포는 괴사가 아닌 암 세포의 사멸이 높은 비율로 유도됨으로써 암 세포로부터 강력한 면역원성 세포 사멸(Immunogenic Cell Death, ICD)을 유도할 수 있다. 25 mW 광에 노출된 경우 암세포의 초기 세포 사멸 세포로부터 CRT와 포스파티딜 세린을 4배 이상 현저히 발현시켜 "eat-me"신호를 노출함으로써 수지상세포(dendritic cell, DC)의 암에 대한 식작용을 촉진하나, 50 mW 광에 노출한 경우에는 CRT 발현이 유의적으로 감소하여 암이 괴사되고 오히려 암의 염증반응을 유도하는 것을 알 수 있다.

[0093] 상기 암 세포는 광이 조사된 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1604 배지에서 1 내지 10% CO_2 조건하에서 30 내지 40 ℃ 온도로 1 내지 5시간 동안 배양할 수 있다.

[0094] 상기 사멸화 암세포는 광이 조사된 후 얻은 세포 그 자체, 이를 포함하는 배양액, 또는 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 세포를 제거한 여액 등의 배양액 자체로부터 파생되는 가공물이거나, 상기 사멸화 암세포를 용해시켜 분리한 용해물(lysate)일 수 있다. 바람직하게 상기 사멸화 암세포는 광이 조사된 후 얻은 세포 그 자체, 이를 포함하는 배양액, 또는 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 세포를 제거한 여액 등의 배양액 자체로부터 파생되는 가공물일 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 사멸화 암세포를 포함하는 배양액, 또는 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 세포를 제거한 여액 등의 배양액 자체로부터 파생되는 가공물일 수 있다.

[0095] 본 발명의 조성물은 대식세포 특히 수지상세포의 암에 대한 식작용을 향상시켜 암의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 가진다.

[0096] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0097] 상기 암은 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 유선암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 비인두 선암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0098] 본 발명에서 상기 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0099] 또한, 본 발명에 따른 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 본 발명의 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose), 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0100] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다.

[0101] 본 발명의 조성물은 의도한 투여 방법에 적합한 임의의 형태일 수 있다. 본 발명의 조성물에 있어서 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여경로는 약물이 목적

조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다

[0102] 본 발명에 따른 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구 또는 비경구일 수 있으며, 상기 비경구 투여는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 피내, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 두개골내, 뇌혈관내(intracerebroventricular), 자궁내, 자궁내 경막, 설하 또는 직장을 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 유효성분이 표적 부위로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0103] 상기 조성물 내의 유효성분의 함량은 조성물의 사용 목적, 제형의 형태 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대, 조성물의 전체 중량 기준으로 0.001 내지 99중 량%, 0.001 내지 90중량%, 0.001 내지 50중량%, 0.01 내지 50중량%, 0.1 내지 50중량%, 또는 1 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다

[0104] 본 발명의 조성물은 사용되는 유효성분의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0105] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0106] **실험재료**

[0107] VPF(Verteporfin)는 Frontier Scientific(Logan, UT, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. TUNEL 분석 키트는 R&D systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. Annexin V/PI 염색 키트는 Sigma Aldrich(Ontario, Canada)에서 구입한 것을 사용하였다. high glucose DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), RPMI 1640 배지, 소 태아 혈청(fetal bovine serum), 페니실린 및 스트렙토마이신은 WELGENE Inc.(Daegu, Republic of Korea)에서 구입한 것을 사용하였다. HMGB1(Anti-mouse high mobility group box 1), HSP70(anti-mouse heat shock protein 70), CRT(anti-mouse calreticulin), anti-β-actin antibodies는 Abcam(Hanam, Republic of Korea)에서 구입한 것을 사용하였다. mouse CD45, mouse CD44, mouse CD8a, mouse CD40, mouse CD62L, mouse CD11c, mouse CD3 및 mouse CD86에 대한 형광 염료 접합 항체는 BioLegend(San Diego, CA, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. B7-H1(Anti-mouse PD-L1 antibody)는 BioXCell(Lebanon, NH, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. CT26(mouse colon adenocarcinoma)은 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. 폴리실록산 아크릴레이트는 MCnet(Gyeonggi-do, Republic of Korea)에서 구입한 것을 사용하였다. photoresist epoxy, SU-8 2는 MicroChem(Round Rock, TX, USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

[0108] **실시예 1 내지 3. 광역학 치료를 위한 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED) 제조**

[0109] 적절한 용량의 광 강도를 생물학적 조직에 정확하게 전달하기 위해, 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)는 다수의 발광 다이오드(LED)(100 μm)가 적층된 마이크로 니들 형상으로 제작되었다(도 2 및 3 참조).

[0110] 우선, 유리 기판(220)의 양 측 말단에 100 μm 두께의 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)로 구성된 스페이서 2개(230, 240)를 각각 이격되게 배치하고, 첨두아치 형상의 마이크로 니들 구조의 패턴을 갖는 포토마스크(210)를 상기 스페이서 상에 위치시켰다. PSA(Polysiloxane acrylate) 전구체를 포토마스크와 유리기판의 틈에 주입하였다. PSA 전구체는 모세관력에 의해 상기 틈에 주입되었다. 상기 포토마스크의 상면을 UV에 노출시켜(250 - 400 nm 파장, 60 mJ/cm^2) 1차 경화하였다. 포토마스크(210)를 제거하고, 경화되지 않은 PSA 전구체를 이소프로판올로 세척하여 제거하였다. 추가 UV를 조사하여(12시간 동안 10mJ/cm^2) 완전히 경화시켜 100 μm 두께의 PSA 재료를 사용하여 첨두아치 형상의 마이크로 니들 구조의 지지부(110)를 제작하였다(도 2).

[0111] 유리 기판 상에 50 nm 두께의 PMMA(폴리(메틸 메타크릴레이트))(MicroChem, USA)로 구성된 희생층(111)을 스핀 코터(Spin-1200D, Midas system, Korea)를 이용하여 증착하였다. 다음 상기 희생층(111) 상에 5 μm 두께의 폴

리이미드 전구체(poly-(pyromellitic dianhydride-co-4,4-oxydianiline)), amic acid solution, Sigma-Aldrich Inc., USA)를 스핀코터(Spin-1200D, Midas system, Korea)를 이용하여 증착한 후, 진공 오븐에서 150 ℃에서 5분, 250 ℃에서 2시간 동안 열처리하여 상기 5 μm 두께의 폴리이미드(PI) 기판(120)을 적층하였다.

[0112] 상기 기판(120) 상에 금속 전극(Cr/Au = 5/100 nm)을 열증발 공정으로 증착한 후, 포토리소그래피 및 습식 에칭 방법으로 패턴화하여, 기판(120) 상에 전극부(140)를 배치하였다.

[0113] 상기 전극부(140)의 전극 패턴 상에 ACA(anisotropic comductive adhesive) 접착제를 코팅하고, 투명 폴리디메틸실록산(PDMS) 엘라스토머를 사용하는 전사 인쇄 공정(deterministic transfer printing process)을 사용하여 상기 전극부(140)와 접촉되도록 1개, 2개 및 4개의 발광 다이오드(131, 132, 133, 134)를 이격 배치하여 광원부(130)를 형성하였다.

[0114] 상기 기판(120)의 상면에 2 μm 두께의 UV 경화형 네거티브 포토레지스트 에폭시 SU-8 2를 사용하여 코팅하여 코팅부(150)을 제조하였다. 상기 기판(120) 상에 Cu 식각 마스크를 배치하고, 플라즈마 식각기를 사용하여 잔류 PI와 PMMA를 식각한 후, 아세톤에 침지하여 기판(120)의 후면에 존재하는 PMMA 희생층을 제거하고 유리기판에서 분리하였다.

[0115] 상기 코팅부(150), 전극부(140), 광원부(130)가 구비된 기판(120)을 상기 지지부(110) 상에 부착하여, 마이크로-발광 다이오드 장치(100)를 제작하였다. 코팅부(150)는 마이크로-발광 다이오드 장치(100)가 세포내 이식되었을 때, 세포 및 생체 유체와의 전기적 간섭을 방지하는 역할을 한다.

[0116] **실험예 1. 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 특성**

[0117] 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 특성을 분석하고자 하였다. 비교예로 발광 다이오드를 부착하지 않은 마이크로-발광 다이오드 장치를 사용하였다.

[0118] 좁고 높은 종횡비를 갖는 마이크로 니들에 집적된 발광 다이오드(LED)가 4개 이상인 경우에는 열이 축적되어 세포 손상을 야기할 수 있고, 과도한 광을 제공하여 항암 치료 효과에 오히려 역효과를 유발할 수 있어, 최대 개수를 4개로 제한하였다. 발광 다이오드(LED)의 수와 입력전력과 광출력의 정확한 상호관련성을 평가하고자 하였다.

[0119] 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치는 디지털 카메라(EOS 60D DLSR, Canon Inc., Tokyo, Japan), 광학 현미경(DM2700M; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 및 전계 방출 SEM(JSM-7600F; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 열적 특성은 적외선 카메라(T420; FLIR System Inc., Wilsonville, OR, USA)를 사용하여 측정하였다. 전기적 특성은 probe station(MST 5500B, MS Tech, Seoul, Korea)과 precision source/measure unit(B2901A; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 평가하였다. 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 광학적 특성은 광 분광계(HR4000; Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA)로 분석하였다.

[0120] 도 4는 실시예 1 내지 3 및 비교예로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 SEM 이미지로, 이에 따르면 마이크로 크기의 발광 다이오드가 기판 상에 일정 간격 이격되어 축 방향으로 위치하고 있으며, 이들은 병렬방식으로 연결된다는 것을 확인할 수 있다.

[0121] 도 5는 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 입력전력(input power)에 따른 광출력 결과 그래프로, 이에 따르면 본 발명에 따른 마이크로-발광 다이오드 장치는 발광 다이오드(LED) 개수가 늘어남에 따라 동일한 입력전력(input power)에서 광세기(light intensity)가 1.5 배 이상 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0122] 또한, 입력전력(input power)이 과도하게 높아질 경우, 열 열화로 인해 효율이 유의적으로 현저히 감소하였고, 이는 마이크로-발광 다이오드 장치에서 구비된 발광 다이오드의 개수가 적을수록 더욱 큰 폭으로 감소하는 것을 알 수 있다.

[0123] 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 성능이 저하되기 시작하는 drooping 시작 시점도 발광 다이오드의 개수가 높을수록 지연되는 것을 알 수 있다.

[0124] 도 6은 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치를 VPF에 조사한 후, 입력전력(input power)에 따른 ROS의 생성정도를 측정하여 나타낸 결과 그래프이다. 광감작제 VPF(Verteporfin)에 실시예 1 내

지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치를 이용해 15분동안 가시광선을 조사하고, ROS 생성을 확인하였다. 상기 ROS 생성 분석은 *p*-nitroso-N,N'-dimethylaniline(RNO)을 사용하여 분석하였다.

[0125] 도 6에 따르면, 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치를 사용하여 15분 동안 가시광선 조사에서 VPF의 ROS 생성은 입력 전력 의존 방식으로 크게 상향 조절되었습니다. 중요한 것은 4개의 LED를 적층한 마이크로 LED가 동일한 인가 전압에서 2개 또는 1개의 LED를 사용하는 것보다 더 높은 ROS 생성을 유발한다는 점입니다.

[0126] **실험예 2. 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 생체독성 분석**

[0127] 본 발명에 따른 마이크로-발광 다이오드 장치의 생체 적합성을 평가하기 위해, ISO 10993-5 방법을 사용하여 세포 독성을 수행하였다.

[0128] 먼저 한국세포주은행으로부터 분양받은 L929(Mouse-fibroblast)를 사용하였다. 세포의 배지는 DMEM 배지를 사용하였고, Medium에 10%(v/v) FBS 및 1%(v/v) 항생제-항진균제(antibiotic-antimycotic)를 첨가하여 petri-dish(REF 351029, BD falcon, USA)에 세포를 5×10^4/ml 만큼 분주한 후, 37℃, 95% 공기, 5% CO_2 배양기에 배양하여 24시간 후 petri-dish의 면적에 80% 이상이 되도록 배양하였다.

[0129] 상기 배양이 완료된 L929 세포는 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치를 20%(v/v)를 담근 DMEM 배지에서, 37 ℃, 24 시간 동안 배양하였다. 비교군(DMSO 5%)로 발광 다이오드 장치 대신에 DMSO 5%(v/v)를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였고, 정상군(con)은 발광 다이오드 장치 대신 DMEM 배지만을 사용하여 배양하였다.

[0130] 상기 각각의 배양액에서 세포 생존율을 확인하기 위하여 10%(v/v) CCK-8(Dojindo, Kumamoto, Japan)을 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0131] 도 7은 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치의 생체 적합성을 평가한 결과 그래프로, 이에 따르면 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치는 유의적인 세포독성이 관찰되지 않은, 생체 안정한 물질임을 확인하였다. 비교군으로 DMSO 5%가 처리된 섬유아세포는 60% 세포 독성이 확인되었다.

[0132] **실험예 3. 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 이식**

[0133] 평균 직경 4~5 mm인 HT29 암 조직에 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치를 삽입시켰고, 그 결과 도 8에서와 같이, 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치는 암 조직에 이식하기에 충분한 기계적 특성을 가지고 있으며, 이식된 후에도 입력전력에 따라 성공적으로 암 조직내에서 광을 내는 것을 확인할 수 있다.

[0134] **실험예 4. 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 이식**

[0135] 5주령 수컷 BALB/c nu/nu 및 BALB/c 마우스는 NaraBio로부터 구입한 후 일주일간 적응기간을 거친 후, 실험에 사용하였다. 음식과 물을 자유롭게 섭취하도록 하였고, 12시간의 명/암 주기로 한국과학기술연구원(KIST)의 무균시설에서 사육하였다.

[0136] 1×10^7 세포(cell) 농도의 HT29 세포를 5주령 마우스의 왼쪽 허벅다리의 피하 주사하였다. 암 크기가 약 100 내지 200 mm^3 만큼 성장할 때까지 사육하여 암 동물모델(tumor-bearing mice)을 제조하였다.

[0137] 상기 암 동물모델 허벅지 암 조직 표면에서 3 mm 깊이까지 실시예 1 내지 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 각각 삽입한 후, 50 mW 입력전력을 다양한 시간별로 인가하고 온도변화를 측정하였다.

[0138] 실험의 통계분석을 위하여 Tukey-Kramer 사후 테스트와 함께 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 수행하였다. 0.05보다 낮은 p 값을 가질 경우에는 *, 0.01보다 낮은 p 값을 가질 경우에는 **, 0.001보다 낮은 p 값을 가질 경우에는 ***로, 0.0001보다 낮은 p 값을 가질 경우에는 ****로 표기하였고, 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시하였다.

[0139] 도 9는 50 mW의 전력이 인가된 실시예 1 내지 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 이식한 암 동물모델의 사진(좌측)과, 적외선 열화상 카메라 이미지(중앙) 및 인가시간에 따른 암 동물모델의 체온 변화를 나타낸 그래프(우측)이다.

[0140] 도 9에 따르면, 4개의 병렬식으로 연결된 발광 다이오드가 구비된 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치

(micro-LED)를 이식하더라도, 암 동물모델의 체온은 최대 34 ℃까지만 상승한다는 것을 확인하였다.

[0141] 상술한 실험 결과를 통해 실시예 1 내지 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 암 조직에 사용할 경우, 열이 발생하긴 하나, 이로 인해 주변 조직 손상은 유발되지 않으며, 암 조직 내에서 충분한 광 출력을 효율적으로 발휘하며, 광감작제로부터의 ROS를 효율적으로 촉진할 수 있는 것을 확인하였다.

[0142] **실험예 5. 광감작제(VPF)의 세포 흡수 거동 분석**

[0143] 1 x 10^5 CT26 세포를 35 mm 공초점 접시(유리 바닥 접시, SPL, 대한민국, 경기도)에 접종한 다음, 24 시간 동안 안정화시켰다. 형광 영상을 검사하기 이전에 상기 CT26 세포들에 0, 1, 3, 6, 24 시간동안 37 ℃ 중에서 VPF(1 μM)를 처리하였다. 이어서, 세포들을 1 ml DPBS로 2회 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 15분 동안 고정하고, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 10분 동안 염색하였다. 다이오드(405 nm), Ar(458, 488, 514 nm) 및 He-Ne(633 nm) 레이저가 구비된 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Leica TCS SP8 laser-scanning confocal microscope)(Leica Microsystems GmbH)을 사용하여 형광 영상들을 얻었다.

[0144] 도 10은 배양시간별(0, 1, 6, 24 시간) VPF로 처리된 CT26 세포에 대한 공초점 형광 이미지이고, 도 11은 3 시간 동안 VPF 처리된 CT26 세포에 대한 공초점 형광 이미지이다. 도 10 및 도 11에 따르면 CT26 세포의 세포질에 광감작제인 VPF(녹색 형광)가 점진적으로 증가하였고, 6시간부터는 크게 감소하는 것을 확인하였다.

[0145] **실험예 6. 시험관 내에서*(in vitro)*, 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 항암 효과-1**

[0146] 1 × 10^5 CT26 세포를 35 mm 공초점 접시(유리 바닥 접시, SPL, 대한민국, 경기도)에 접종한 다음, 24 시간 동안 안정화시켰다. 형광 영상을 검사하기 이전에 상기 CT26 세포들에 3 시간동안 37 ℃ 중에서 VPF(1 μM)를 처리하였다.

[0147] 상기 세포배양 접시 바닥에 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 부착하고, 다양한 입력전력(0.15 mW, 7.5 mW, 25 mW, 50 mW)으로 가시광선을 15분 동안 조사하였다. 이어서, 세포들을 1 ml DPBS로 2회 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 15분 동안 고정하고, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 10분 동안 염색하였다. 다이오드(405 nm), Ar(458, 488, 514 nm) 및 He-Ne(633 nm) 레이저가 구비된 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Leica TCS SP8 laser-scanning confocal microscope)(Leica Microsystems GmbH)을 사용하여 형광 영상들을 얻었다.

[0148] 도 12는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 공초점 형광 이미지이다. 도 13은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 세포 생존율을 분석하여 나타낸 그래프이다. 도 14는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 Live/Dead 분석결과이다.

[0149] 도 12 내지 도 14에 따르면, 0.15 mW의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 세포들에서는 유의한 세포 사멸이 관찰되지 않았다.

[0150] 7.5 mW 이상의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 세포들에서는 광감작제로부터 ROS 생성을 촉진하여 세포 독성을 유의적으로 유도하여 세포생존율이 60% 감소하였다.

[0151] **실험예 7. 시험관 내에서*(in vitro)*, 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 항암 효과-2**

[0152] 2 × 10^5 CT26 세포를 35 mm 공초점 접시(유리 바닥 접시, SPL, 대한민국, 경기도)에 접종한 다음, 24 시간 동안 안정화시켰다. 형광 영상을 검사하기 이전에 상기 CT26 세포들에 3 시간동안 37 ℃ 중에서 VPF(1 μM)를 처리하였다.

[0153] 상기 세포배양 접시 바닥에 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 부착하고, 다양한 입력전력(0.15 mW, 7.5 mW, 25 mW, 50 mW)으로 가시광선을 15분 동안 조사하였다. 이어서, 세포들의 상등액(supernatants)을 회수하고, 이로부터 CRT 표면 발현 및 HMGB1, ATP 및 HSP70의 세포외 방출을 분석하여, 암세포의 DAMP를 평가하였다.

[0154] ATP는 상용화된 ATP 분석 키트(Beyotime Biotechnology, Jiangsu, China)를 사용하여 분석하였다. HMGB1 및 HSP 70은 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다.

[0155] 또한, CRT 표면 발현은 세포를 4 ℃에서 24시간 동안 FITC 결합된 CRT 항체로 염색한 후 유세포분석기(BD FACSVerse, BD Bioscience, USA)와 Leica TCS SP8 레이저 스캐닝 공초점 현미경을 사용하여 분석하였다.

[0156] 광 조사에 따른 세포자멸사를 평가하기 위하여, 상기 각각의 세포를 회수하고, Annexin V-FITC(5 μg) 및 propidium iodide(PI, 10 μg)를 함유하는 결합 완충액과 함께 37 ℃에서 15 분 동안 배양한 후, 유세포 분석기(BD FACSVerse, BD Bioscience, USA)를 통해 분석하였다.

[0157] 도 15 및 도 16은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 Annexin V/PI 분석 그래프이고, 도 17은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 CRT 발현 그래프이고, 도 18은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포의 CRT 발현을 분석한 형광 영상(a)과 유세포 분석 그래프(b)이다.

[0158] 도 15 및 도 16에 따르면, 25 mW와 50 mW의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 세포들의 세포 사멸 비율은 유사하나 패턴은 분명하게 다르다는 것을 알 수 있다.

[0159] 25 mW 광의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 CT26 세포는 초기 세포사멸(early apoptosis)(8.53 ± 0.89%)/후기 세포사멸(late apoptosis)(49 ± 4.73%)와 낮은 괴사(necrosis)(16.63 ± 3.27%)를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0160] 반면, 50 mW의 광의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 CT26 세포는 유의하게 높은 괴사(60.77 ± 2.63%)가 확인되었고, 낮은 초기 세포사멸(0.82 ± 0.4%)/후기 세포사멸(11.92 ± 2.35%)를 갖는 것으로 확인되었다.

[0161] 실험결과를 종합하면, 25 mW 광의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출되었을 때, 암 세포로부터 강력한 면역원성 세포 사멸(Immunogenic Cell Death, ICD)을 유도할 수 있다는 것을 알 수 있다. 이는 50 mW 광 강도에서는 확인할 수 없는 독특한 세포 사멸 패턴이다.

[0162] 도 17 및 도 18에 따르면, 25 mW 광의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출되면, 암세포의 초기 세포 사멸 세포로부터 CRT와 포스파티딜 세린을 발현하여 "eat-me"신호를 노출시켜 수지상세포(dendritic cell, DC)의 식작용을 촉진한다는 것을 알 수 있다. 반면 50 mW 광의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출되면, CRT 발현이 유의적으로 감소하기 시작하는 것을 알 수 있다.

[0163] 암세포는 25 mW 광의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)부터 CRT 발현이 증가하였으며, 구체적으로 naive 세포보다 유의적으로 4.1-4.32배 더 증가하였다.

[0164] 그러나 50 mW 광의 실시예 3으로부터 제조된 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에서는 감소하였는 바, 이는 과도하게 높은 광이 조사되는 경우 암세포의 사멸이 아닌 괴사가 유의적으로 더 높이 발생한다는 것을 알 수 있다. 이는 앞서 설명한 바와 같이 ICD 유도 효과가 낮아 바람직하지 않다.

[0165] 도 19는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포에서의 HMGB1, ATP 및 HSP70 발현 그래프이고, 도 20은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포에서의 HMGB1 및 HSP70 발현을 분석한 웨스턴 블롯 결과이다.

[0166] 도 19 내지 20에 따르면, 25 mW 광 강도의 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 암세포(CT26)에서는 다른 광 강도보다 HMGB1, ATP 및 HSP70을 포함한 여러 DAMP가 유의적으로 방출된다는 것을 확인할 수 있다.

[0167] 상기 방출된 DAMP들은 후기 세포사멸 상태의 암 세포로부터 "find-me" 신호를 방출하여. T 세포로부터 암 관련 항원을 교차제시(cross presentation)하여 수지상세포(DC)의 성숙을 유도한다. 그러나 암세포의 괴사는 "do not eat-me"라는 부정적 탐식(negative engulfment) 신호를 유도하는 CD47을 표면에 노출하기 때문에, 면역학적으로 유해하다.

[0168] 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치를 사용하였을 때, 50 mW 보다 25 mW의 광 강도로 처리된 경우 CT26 세포에서 1.61-1.72배, 1.31-1.4배 및 2.01-2.23배 더 큰 HMGB1, ATP 및 HSP70을 방출하였다. 이는 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치는 25 mW의 광도에서 암세포의 강력한 ICD를 유도함으로써 DAMP를 촉진한다는 것을 알 수 있다.

[0169] 따라서 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 사용함에 있어서, 암 세포로부터 괴사를 더 많이 유도하는 50 mW 광강도보다 세포사멸을 유도하는 25 mW 광강도 조건인 것이 강력한 ICD를 유도하는 데 유의적으로 바람직하다는 것을 알 수 있다.

[0170] **실험예 8. 시험관 내에서*(in vitro)*, 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 항암 효과-3**

[0171] 수지상 세포(DC)의 성숙(maturation)과 대식세포의 식작용(phagocytosis)을 평가하기 위해 2 × 10^6 CT26 세포를 100-pi 세포 배양 접시에 접종하고, 24 시간동안 안정화시킨 다음, 3시간 동안 VPF(1 μM)로 처리하여 배양하였다. 상기 배양액에 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 사용하여 0 - 50mW의 광 강도로 15분 동안 가시광선을 조사하였다. 그런 다음, 각각의 CT26 세포와 배양액을 BALB/c 마우스로부터 회수한 BMDC(Bone marrow-derived dendritic cell) 또는 BMDM(Bone marrow-derived macrophage)와 24 시간동안 공동배양(co-culture)하였다. 마지막으로, 성숙한 DC($CD11c^+CD40^+CD86^+$)와 BMDM에 의한 암세포 식작용을 유세포 분석기(BD FACSVerse, BD bioscience, USA) 및 Leica TCS SP8 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Leica Microsystems GmbH)을 사용하여 분석하였다.

[0172] 도 21 및 도 22는 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 CT26 세포와 공동 배양한 BMDC에서 발현된 성숙 수지상세포($CD11c^+CD40^+CD86^+$)를 유세포 분석기로 측정하여 분석한 결과 그래프이다.

[0173] 도 23은 VPF로 3시간 처리한 후 다양한 광 강도로 조사된 PHrodo 표지된 CT26 세포와 CMFDA로 표지된 BMDM를 공동배양한 후, 공초점 현미경으로 촬영한 형광 사진과 식작용 정도를 분석한 그래프이다.

[0174] 도 21 및 도 22에 따르면 25 mW 광 강도의 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 CT26 세포는 유의적으로 높은 비율로 성숙 수지상세포(CD11c+CD40+CD86+)가 발현되는 것을 알 수 있다. 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 광 강도를 50 mW로 높이면, 암세포는 괴사되는 비율이 증가하여 성숙 수지상세포 발현비율이 유의적으로 감소하였다.

[0175] 도 23에 따르면, 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 CT26 세포를 BMDM와 공동배양하였을 때도 앞선 실험과 유사한 경향이 확인되었다.

[0176] 25 mW 광 강도의 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)에 노출된 암세포(CT26)에서의 식작용(18.94 ± 2.96%)이 다른 세포들보다 유의적으로 높았다.

[0177] 상술한 결과를 통해 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)는 25 mW의 최적 광 강도 조건에서, 암세포로부터 강력한 ICD를 유도하여 항암면역을 유발하고, 대식세포의 수지상세포(DC) 성숙과 식작용을 유의적으로 상향 조절한다는 것을 알 수 있다.

[0178] **실험예 9. 동물모델에서 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 항암 효과**

[0179] 본 발명에 따른 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 사용할 경우, 생체 내에서 항암효과를 분석하고자 하였다.

[0180] 암 동물모델(tumor-bearing mice)

[0181] 실험쥐는 음식과 물을 자유롭게 섭취하도록 하였고, 12시간의 명/암 주기로 한국과학기술연구원(KIST)의 무균시설에서 사육하였다. 5주령 수컷 BALB/c nu/nu 마우스는 NaraBio(Gyeonggi-do, Republic of Korea)로부터 구입한 후 일주일간 적응기간을 거친 후, 실험에 사용하였다. 모든 동물실험은 KIST 동물관리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 관련법령 및 기관지침에 따라 진행되었고, IACUC에서 실험을 승인하였다(approved number 2020-123).

[0182] 1 × 10^6 세포(cell) 농도의 CT26 세포를 5주령 수컷 BALB/c nu/nu 마우스의 왼쪽 허벅다리의 피하 주사하였다. 암 크기가 약 60 내지 80 mm^3 만큼 성장할 때까지 사육하여 암 동물모델을 제조하였다

[0183] 치료

[0184] 암 동물모델 각각에 VPF(4 mg/kg)을 꼬리 정맥을 통해 2일 간격으로 두 번 투여하고, 암 크기가 약 60 내지 80 mm^3 만큼 성장하면, 암 처리를 다음과 같이 달리하여 6 가지 그룹을 제조하였다. (i) saline, (ii) LED, (iii) 0.15 mW, (iv) 7.5 mW, (v) 25 mW and (vi) 50 mW.

[0185] 상기 (i) saline 군은 VPF가 처리된 암 동물모델에 아무런 광도 조사하지 않은 것이다.

[0186] (iii) 내지 (vi)군은 상기 암 동물모델의 암 조직에 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 꽂고

90분 동안 각각 서로 다른(0.15 mW, 7.5 mW, 25 mW, 50 mW) 광세기로 조사한 것이다.

[0187] 상기 (ii) LED군은 VPF가 처리되지 않은 암 동물모델을 사용하고, 발광 다이오만을 사용하여 50 mW 광세기로 조사한 것이다.

표 1

[0188]

	처리
대조군 (saline)	암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg 2일간격으로 2회 투여 -> saline 투여
비교군 (LED)	암 동물모델 -> saline 4 mg/kg 2일간격으로 2회 투여 -> 발광 다이오드 50 mW로 90분 동안 조사함
OFF군	암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg 2일간격으로 2회 투여 -> 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치로 0 mW의 광 강도의 가시광선을 90분 동안 조사함
실험군 1 (0.15 mW)	암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg 2일간격으로 2회 투여 -> 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치로 0.15 mW의 광 강도의 가시광선을 90분 동안 조사함
실험군 2 (7.5 mW)	암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg 2일간격으로 2회 투여 -> 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치로 7.5 mW의 광 강도의 가시광선을 90분 동안 조사함
실험군 3 (25 mW)	암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg 2일간격으로 2회 투여 -> 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치로 25 mW의 광 강도의 가시광선을 90분 동안 조사함
실험군 4 (50 mW)	암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg 2일간격으로 2회 투여 -> 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치로 50 mW의 광 강도의 가시광선을 90분 동안 조사함

[0189] 상기 각 군으로부터 암 부피는 2일마다 측정하였고, 최대 직경 × 최소 직경^2 × 0.53으로 계산하였다. 항암면역을 분석하기 위하여 각 군을 치료 14일째 희생시키고 암조직을 회수한 후, 조직으로부터 Tumor Dissociation Kit(Miltenyi Biotec)를 사용하여 단일 세포를 분리하였다. 세포계수 후, 비특이적 항체 결합을 방지하기 위하여 단일 세포를 FcBlock로 처리하여 10분 동안 배양하였다. 다음 암 조직에서 하기 개체군을 확인하기 위해 다중매개변수 염색(multi-parameter staining)을 수행하였다:(i) CRT^+ tumor cells ($CD45^-CRT^+$), (ii) cytotoxic T lymphocytes(CTLs; $CD45^+CD3^+CD8^+$), (iii) mature DCs($CD11c^+CD40^+CD86^+$) 및 (iv) regulatory T cells(Tregs; $CD3^+CD4^+CD25^+$).

[0190] 통계분석

[0191] 실험의 통계분석을 위하여 Student's t-test를 사용하여 그룹 간 평균수치 유의차를 확인하였으며, 두 개 이상의 실험 그룹의 비교는 다중 비교를 위한 Tukey-Kramer 사후 테스트와 함께 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 수행하였다. 생존율은 Kaplan-Meier 그래프로 도식화하고, log-rank test를 사용하여 분석하였다. 0.05보다 낮은 p 값을 가질 경우에는 *, 0.01보다 낮은 p 값을 가질 경우에는 **, 0.001보다 낮은 p 값을 가질 경우에는 ***로 표기하였고, 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시하였다.

[0192] 도 24는 VPF로 3시간동안 처리 된 암 동물모델의 암 조직의 형광 사진(우측)과, 시간에 따라 촬영한 비침습적 NIRF 사진(좌측)으로, 이에 따르면 VPF(녹색 형광)는 정맥 주사 후, 3시간이 지난 시점에서 상당한 암 축적 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0193] 도 25는 OFF군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4에 대한 광학 이미지로, 이에 따르면 동물의 암 조직에 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치가 용이하게 이식될 뿐만 아니라, 작동도 성공으로 수행된다는 것을 확인하였다.

[0194] 도 26은 시간에 따른 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4로부터 암 부피변화를 나타낸 그래프와 사진 및 암퇴화율(CR)을 나타낸 그래프이다. 도 27은 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 부피를 육안으로 비교하기 위해 촬영한 사진이다.

[0195] 도 26에 따르면 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3의 암 부피(130.88±38.27mm^3)는 0.15 mW 광 강도에 노출된 실험군 1(1412.09±114.86mm^3) 및 7.5 mW 광 강도에 노출된 실험군 2(484.68±88.11mm^3)에 비해, 암 진행이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

[0196] 도 26 및 도 27에 따르면, VPF없이 가시광선만 조사된 비교군(1477.53 ± 120.67 mm^3)과 식염수만 투여한 대조군(1501.4 ± 103.53 mm^3)은 암 부피가 증가할 뿐 감소하지는 않았다.

[0197] 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3은 다른 실험군 1, 2, 4에 비해 유의적으로 현저히 높은 암 퇴화율(CR: 40%)이 관찰되었다.

[0198] 도 28은 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4로부터 암 조직을 회수하고, 이를 TUNEL로 염색한 형광 사진이고, 도 29는 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4로부터 암 조직을 회수하고, 이를 H&E 염색한 형광 사진이다.

[0199] 도 28 및 도 29에 따르면, 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3의 암 조직에서 명확한 세포자멸이 확인되었고, 다른 실험군 1, 2, 4에 비해 유의적으로 현저한 항암효과를 갖는 것을 알 수 있다.

[0200] 도 30a는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 표면 CRT 발현된 암세포($CD45^-CRT^+$)에 대한 유세포 분석 결과이고, 도 30b는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 세포로부터 방출된 HMGB1에 대한 그래프이며, 도 30c는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 cytotoxic T lymphocytes(CTLs;CD45+CD3+CD8)과 성숙 수지상세포(CD11c+CD40+CD86+)에 대한 유세포 분석 결과이며, 도 30d는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 IFN-τ에 대한 유세포 분석 결과이며, 도 30e는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 조절 T lymphocytes(Tregs;CD3+CD4+CD5+)에 대한 유세포 분석 결과이며, 도 30f는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직을 항-CD8 또는 항-CD25로 염색한 형광 사진이며, 도 30g는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직 상등액에서 IL-10의 발현량을 측정한 그래프이다.

[0201] 도 31은 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직 상등액으로부터 HMGB1을 측정한 결과이고, 도 32a는 14일째 대조군, 비교군, 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4의 암 조직에서 cytotoxic T lymphocytes(CTLs;CD45+CD3+CD8)와 성숙 수지상세포(CD11c+CD40+CD86+)에 대한 유세포 분석결과이며, 도 32b는 암 조직에서 조절 T lymphocytes(Tregs;CD3+CD4+CD5+)에 대한 유세포 분석 결과이다.

[0202] 도 30에 따르면 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3은 다른 군(실험군 1, 2, 4)과 비교하여 암 조직에서 CRT 발현 암세포와 HMGB1 발현이 유의미하게 현저히 증가된 것으로 확인되었다.

[0203] 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치는 25 mW 광 강도로 조사하는 것이, 가장 유의적으로 우수한 ICD를 유도한다는 것을 확인하였다. 구체적으로 25 mW 광 강도로 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치를 조사할 경우, 성숙 수지상세포($CD11c^+CD40^+CD86^+$; 6.83 ± 0.77%) 및 cytotoxic T lymphocytes(CTLs; $CD45^+CD3^+CD8^+$; 12.17 ± 0.72%)의 비율이 0.15 mW의 실험군 1(mature DC: 3.77 ± 0.37% 및 CTL: 7.72 ± 0.47%), 7.5 mW의 실험군 2(mature DC: 4.53 ± 0.32% 및 CTL: 9.568%) 및 50 mW의 실험군 4(mature DC: 4.11 ± 0.87% 및 CTL: 8.31 ± 0.71%)보다 유의미하게 증가하였다.

[0204] 또한, 도 30d 및 도 32에 따르면 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3의 암 조직에서 높은 CTL활성과 IFN-τ의 증가된 농도를 확인하였다. 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3에서는 조절 T lymphocytes(Tregs; $CD3^+CD4^+CD25^+$)의 양이 유의적으로 감소하였다.

[0205] 도 30g에 따르면, 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3의 암조직에서 높은 CTL(적색)과 낮은 Tregs(녹색)가 조직학적 분석을 통해 추가로 확인되었고, 50 mW 광 강도에 노출된 실험군 4의 암조직에서는 Treg가 다른 모든 그룹에 비해 상당히 증가하였다.

[0206] 빛의 세기가 25 mW를 초과하는 경우에는 Treg의 활성화를 일으키는 암 조직이 괴사하게 되고, 이로 인해 심각한 염증 반응이 유발된다는 것을 알 수 있다.

[0207] 또한, 도 30f에 따르면, 50 mW 광 강도에 노출된 실험군 4보다 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 3에서 IL-10이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있는 바, 50 mW 광 강도에 노출된 실험군 4은 높은 염증 반응과 같은 부작용이 나타나는 것으로 확인되었다.

[0208] 종합하면, 본 발명에 따른 마이크로-발광 다이오드 장치는 단순한 외력으로 찔러 넣는 것만으로 암 조직에 용이하게 삽입 및 이식이 가능하고, 암 조직 내에서 국소적인 광 조사가 가능하며, 25 mW의 광 강도에 암 조직만을

노출시킴으로써, 염증반응과 같은 부작용없이 암에 대한 면역활성을 높이고, 광감작제에 의한 암세포 사멸을 유도하여 지속적인 암치료를 제공할 수 있다.

[0209] **실험예 10. 면역관문억제제 처리에 따른 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)의 결장암에 대한 항암 효과**

[0210] 본 발명에 따른 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)와 다른 항암 치료제와의 병용사용에 따른 부작용, 치료여부를 분석하고자 하였다.

[0211] 암 동물모델(tumor-bearing mice)

[0212] 실험쥐는 음식과 물을 자유롭게 섭취하도록 하였고, 12시간의 명/암 주기로 한국과학기술연구원(KIST)의 무균시설에서 사육하였다. 5주령 수컷 BALB/c nu/nu 마우스는 NaraBio(Gyeonggi-do, Republic of Korea)로부터 구입한 후 일주일간 적응기간을 거친 후, 실험에 사용하였다. 모든 동물실험은 KIST 동물관리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 관련법령 및 기관지침에 따라 진행되었고, IACUC에서 실험을 승인하였다(approved number 2020-123).

[0213] 1×10^6 세포(cell) 농도의 CT26 세포를 5주령 수컷 BALB/c nu/nu 마우스의 복강 내에 주사하여 암 크기가 약 60 내지 80 mm^3이 되면 결장암 동물모델로 실험을 수행하였다.

[0214] 치료

[0215] 암 동물모델 각각에 VPF(4 mg/kg)는 정맥으로 주사하고 항PD-L1 항체(10mg/kg)는 복강(i.p)을 통해 2일 간격으로 두 번 주사하고, 3시간이 지난 후 다음과 같이 처리하여 3 그룹을 제조하였다. 대조군(saline), 실험군 5(25 mW + αPD-L1), 실험군 6(50 mW + αPD-L1).

[0216] 상기 대조군은 아무런 광도 조사하지 않은 암 동물모델이고, 실험군 5, 6은 상기 암 동물모델의 암 조직에 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)를 꽂고 90분 동안 각각 서로 다른(25 mW 또는 50 mW) 광세기로 조사한 것이다.

표 2

[0217]

	처리
대조군 (saline)	결장암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg와 항PD-L1 항체(10mg/kg)를 복강 내로 2일 간격으로 2회 투여 -> saline 투여
실험군 5 (25 mW)	결장암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg와 항PD-L1 항체(10mg/kg)를 복강 내로 2일 간격으로 2회 투여 -> 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치로 25 mW의 광 강도의 가시광선을 90분 동안 조사함
실험군 6 (50 mW)	결장암 동물모델 -> VPF 4 mg/kg와 항PD-L1 항체(10mg/kg)를 복강 내로 2일 간격으로 2회 투여 -> 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치로 50 mW의 광 강도의 가시광선을 90분 동안 조사함

[0218] 상기 각 군으로부터 암 부피는 2일마다 측정하였고, 최대 직경 × 최소 직경^2 × 0.53으로 계산하였다. 항암면역을 분석하기 위하여 각 군을 치료 50일째 희생시키고 암조직을 회수한 후, 조직으로부터 Tumor Dissociation Kit(Miltenyi Biotec)를 사용하여 단일 세포를 분리하였다. 세포계수 후, 비특이적 항체 결합을 방지하기 위하여 단일 세포를 FcBlock로 처리하여 10분 동안 배양하였다. 다음 암 조직에서 하기 개체군을 확인하기 위해 다중매개변수 염색(multi-parameter staining)을 수행하였다:(i) CRT^+ tumor cells ($CD45^-CRT^+$), (ii) cytotoxic T lymphocytes(CTLs; $CD45^+CD3^+CD8^+$), (iii) mature DCs($CD11c^+CD40^+CD86^+$) 및 (iv) regulatory T cells(Tregs; $CD3^+CD4^+CD25^+$).

[0219] 또한, 치료 후 50일째에, 실험군 6의 동물모델은 암 조직의 완전한 치료 상태가 확인되었다. 이러한 CR(Complete Response) 상태의 실험군 6에 CT26 세포(1×10^6)를 다시금 동일한 장소에 재접종한 후, 암 부피 변화를 2일마다 측정하고, $CD8^+$ 효과기/효과기 기억 T 세포($CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^{Low}$)에 대한 유세포 분석을 수행하였다. 다음 첫 번째 암 접종으로부터 65일째에 혈청 시료를 회수하고 IFN-τ 및 IL-6를 ELISA 키트를 사용하여 분석하였다.

[0220] 도 33은 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 암부피 변화를 촬영한 사진이고, 도 34는 대조군, 실험

군 5 및 실험군 6으로부터 14일 째 정상조직의 손성여부를 조직학적으로 확인한 결과이다.

[0221] 도 35a는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 암 부피를 측정하여 나타낸 그래프이고, 도 35b는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 14일 째 암 조직을 TUNEL로 염색한 형광 사진이다. 도 35c는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 체중변화를 나타낸 그래프이고, 도 35d는 대조군, 실험군 5 및 실험군 6으로부터 시간별 생존율을 측정하여 나타낸 그래프이다. 도 35e 및 도 35f는 CR 상태의 실험군 6으로부터 $CD8^+$ 효과기/효과기 기억 T 세포($CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^{Low}$)를 유세포 분석한 결과이고, 도 35g는 CR 상태의 실험군 6에 CT26 세포를 재접종한 후 암 성장을 시간별로 확인한 결과이며, 도 35h는 CR 상태의 실험군 6에 CT26 세포를 재접종한 후 15일째 혈청을 회수하여, IFN-τ와 IL-6 발현양을 분석한 결과 그래프이다.

[0222] 도 32 내지 도 35에 따르면, 실시예 3의 마이크로-발광 다이오드 장치(micro-LED)와 항PD-L1 항체를 병용 처리하는 경우, 유의하게 암 예방 또는 치료 효과를 갖는 것을 확인하였다. 특히 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 5는 실험군 6에 반해 유의적인 암 치료효과가 확인되었다.

[0223] 도 35b, 도 35c, 도 35d 및 도 33에 따르면, 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 5는 면역관문억제제와의 병용치료를 통해 암 세포가 거의 완전한 사멸이 확인되었고, 체중감소나 주요 정상기관의 손상 등의 부작용은 관찰되지 않았다.

[0224] 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 5는 최대 50일 동안 100% CR 상태(CR: 5/5)를 유지하였으나, 50 mW 광 강도에 노출된 실험군 6은 암의 성장이 지연될 뿐 완전히 사멸시키지 못하였으므로 40일 이내에 사망하는 것을 확인하였다. 대조군은 20일 이내에 모두 사망하였다.

[0225] 실험군 6과 같이, 과도한 광 강도에 노출하는 경우, 암세포로부터 면역억제성(immunosuppressive) 사이토카인의 방출을 유발하고, 심각한 염증 반응을 야기하여 조절 T 세포를 활성화되므로, 병용치료에도 불구하고 암 치료효능이 저하되어, 완전한 암치료를 달성할 수 없다는 문제가 있다.

[0226] 도 35e 및 도 35f에 따르면, 25 mW 광 강도에 노출된 실험군 5는 효과기/효과기 기억 T 세포(T_{em}; $CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^{Low}$)를 통해 완전한 암 치료 상태(CR mice)인 것으로 확인되었으며, 더 나아가 이전에 발생한 암세포에 의한 재발을 방지하는 면역학적 기억이 확립되었음을 확인하였다.

[0227] 도 35e에 따르면, CR 상태의 실험군 6에서는 CD8+ T 세포에서 CD62L의 상당한 감소가 확인되었고, T_{em} 세포는 정상군(naive mice)(10.74 ± 1.04%)보다 유의하게 증가(20.2 ± 1.85%)하였다는 것을 알 수 있다.

[0228] 도 35g에 따르면, CR 상태의 실험군 6에 CT26 암세포 재접종한 결과 암에 대한 내성으로 인해 제대로 성장하지 못하고 빠르게 치료되는 것을 확인하였다. 이에 반해 정상군(naive mice)에 CT26 암세포를 접종한 결과 15일 만에 최대크기로 빠르게 암이 성장하였다.

[0229] 도 35h에 따르면 CR 상태의 실험군 6에 CT26 암세포 재접종하고, 14일째 혈청을 회수하여 IFN-τ 및 IL-6과 같은 사이토카인의 수준을 분석한 결과, 유의적으로 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0230] 즉, CR 상태의 실험군 6은 암에 대한 면역학적 기억을 가져, 별도의 약물을 추가하지 않더라도 강력한 항암 효과를 얻는 것을 확인할 수 있다.

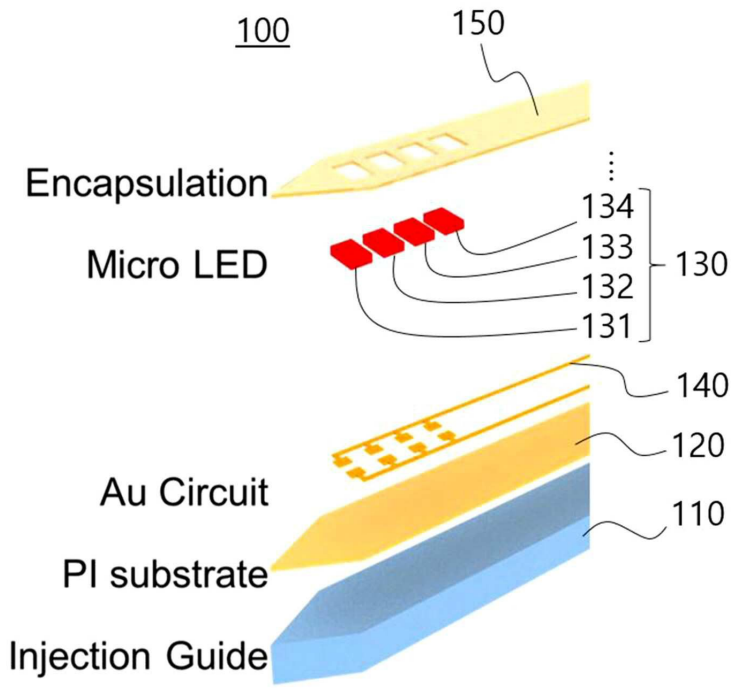
[0231] 본 발명은 암 치료를 위한 최적의 광 강도를 최적의 시간에 암 조직 내에 제공할 수 있는 광역학 치료용 이식형 마이크로-발광 다이오드 장치(실시예 3)에 관한 것으로, 면역관문억제제와의 병용치료를 통해 완전한 암 예방과 치료가 가능하며, 암이 재발되더라도 생체내 암 면역이 형성되어 있으므로, 암을 스스로 치유함으로써 암 재발을 억제하는 암 특이적 적응 면역을 형성하도록 하는 장기적 약리효과를 갖는다.

도면

도면1


100
130

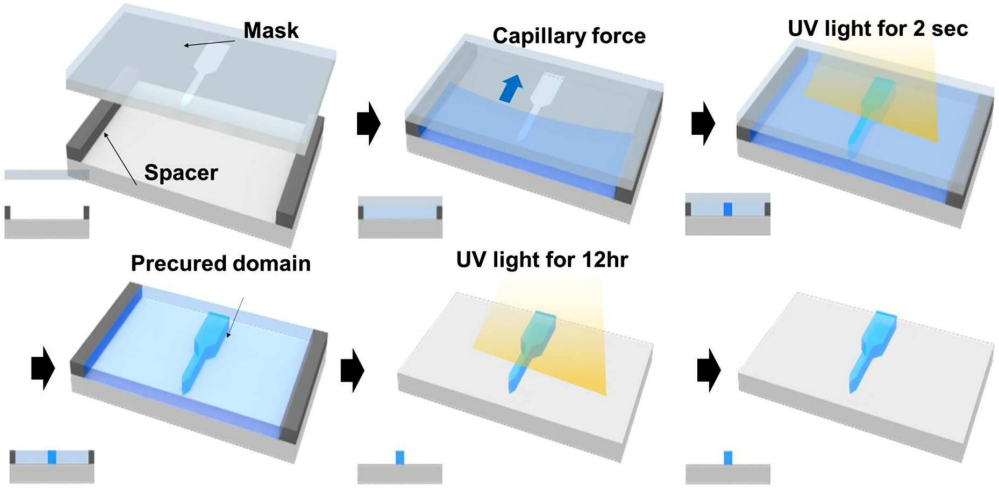
도면2a


100
150
Encapsulation
Micro LED
134
133
132
131
130
140
120
110
Au Circuit
PI substrate
Injection Guide

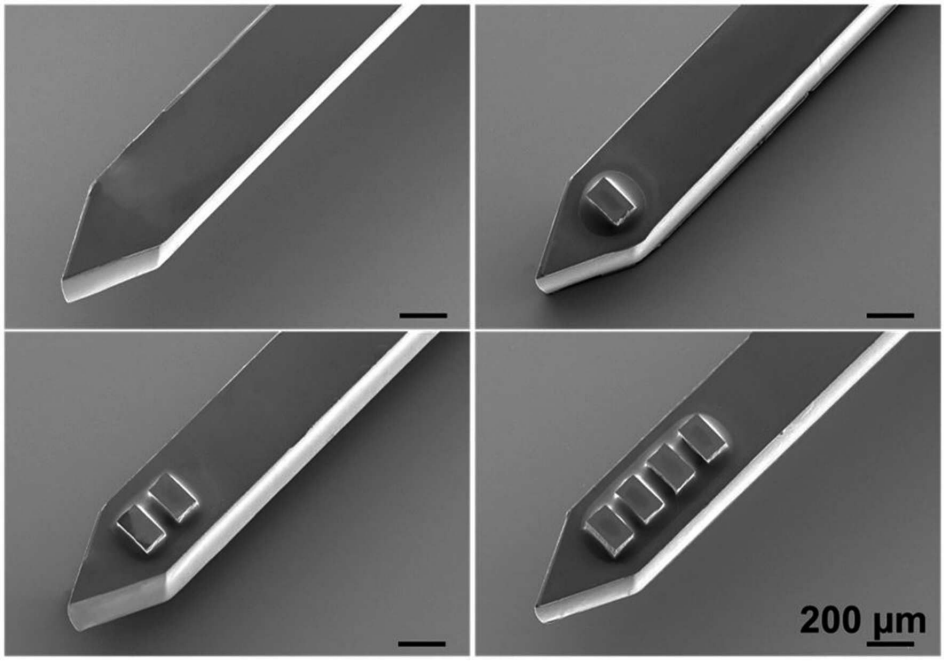
도면2b


2.25 mm
0.5 mm
5.5 mm
LED on
Thickness : 0.15 mm

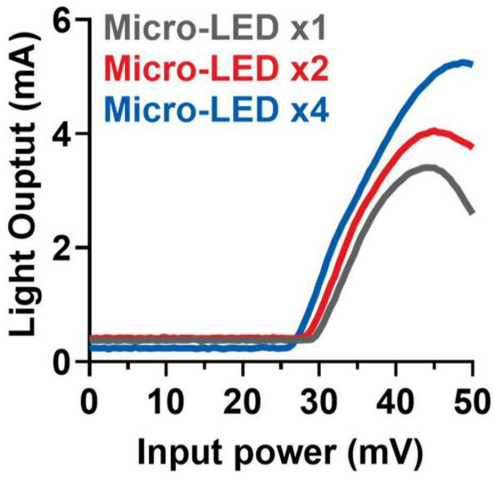
도면3


Mask
Spacer
Capillary force
UV light for 2 sec
Precured domain
UV light for 12hr

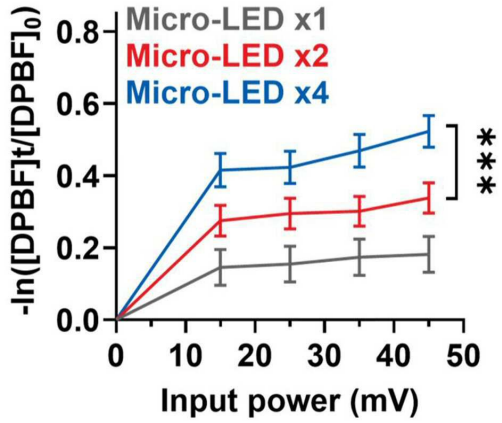
도면4


200 μm

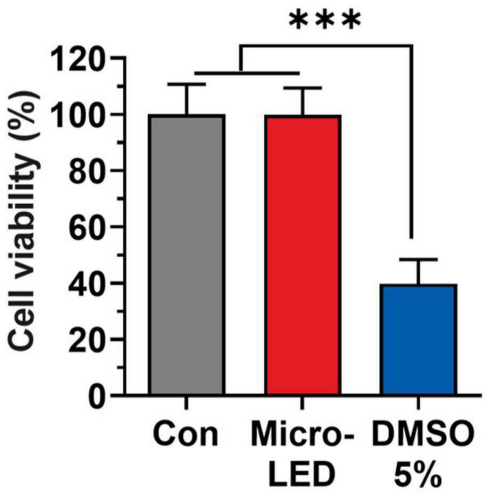
도면5


Micro-LED x1
Micro-LED x2
Micro-LED x4
Light Ouptut (mA)
0
2
4
6
0
10
20
30
40
50
Input power (mV)

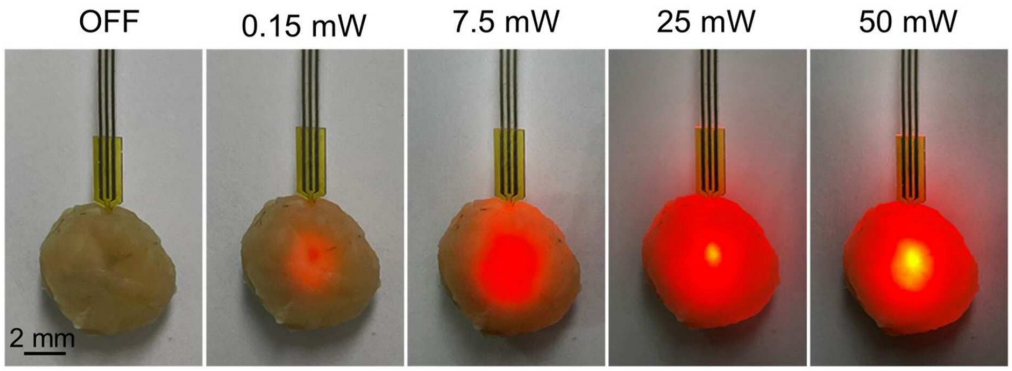
도면6


Micro-LED x1
Micro-LED x2
Micro-LED x4
-ln([DPBF]t/[DPBF]0)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
***
0
10
20
30
40
50
Input power (mV)

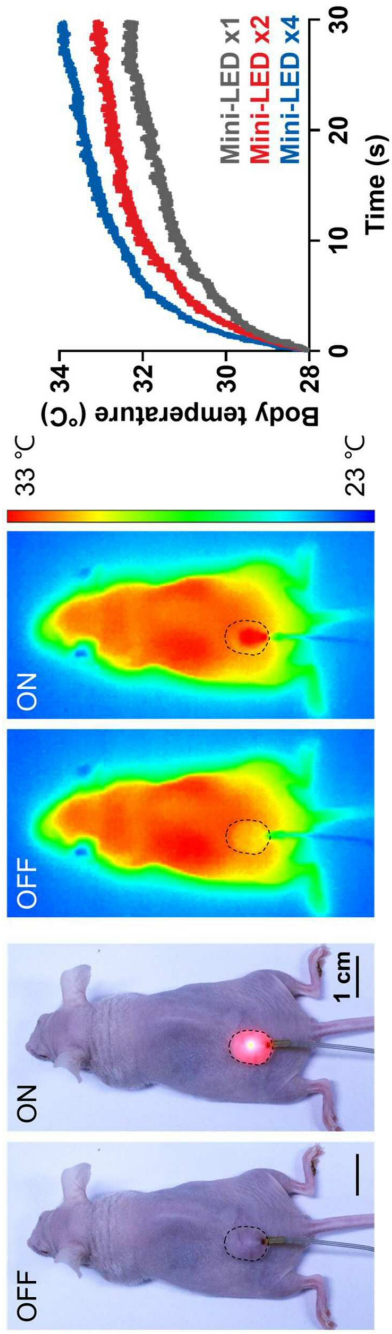
도면7


***
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
Con
Micro-LED
DMSO 5%

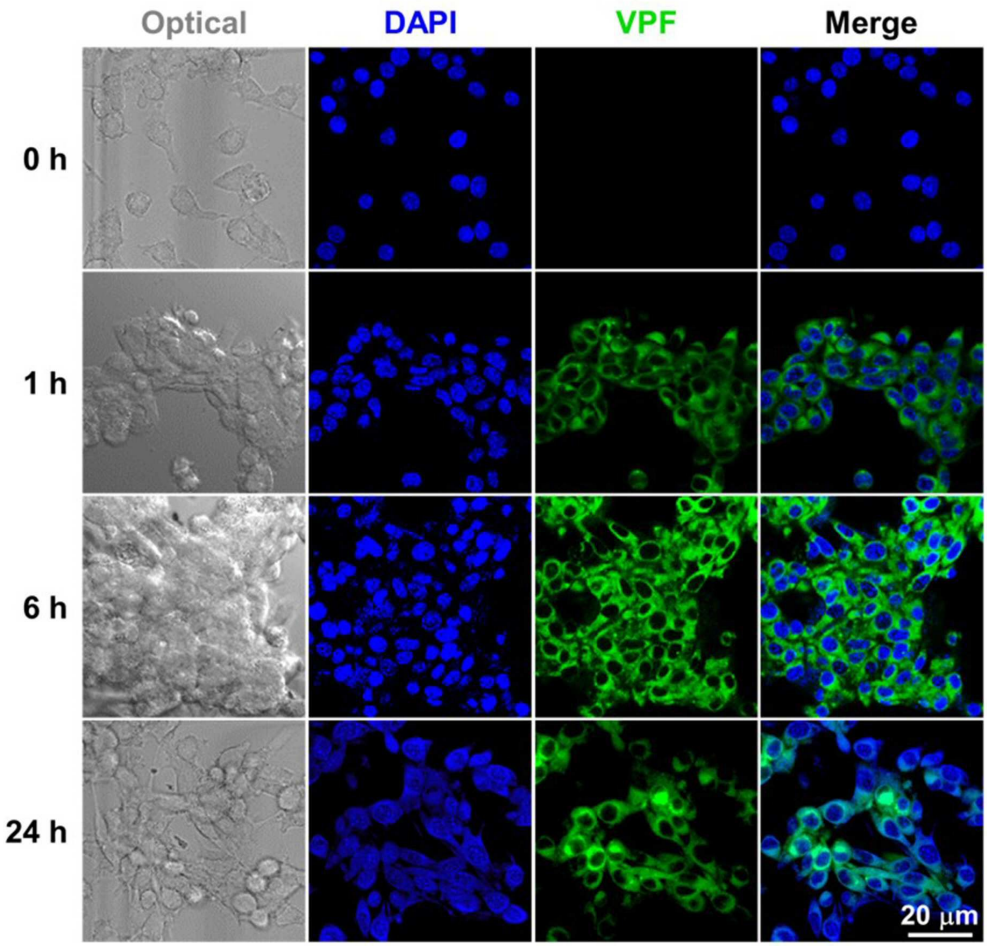
도면8


OFF
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
2 mm

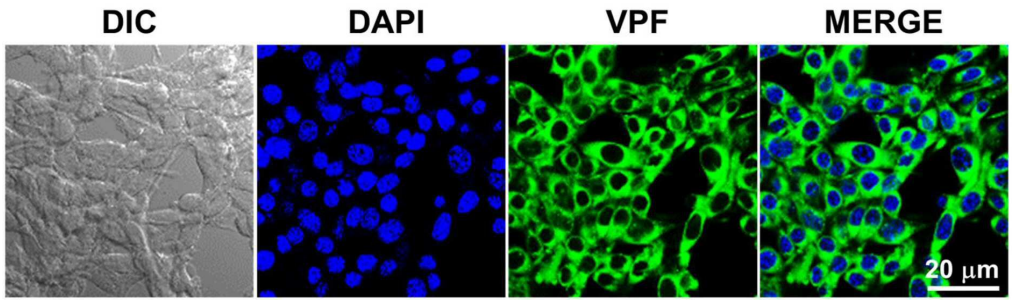
도면9


Mini-LED x1
Mini-LED x2
Mini-LED x4
Time (s)
0
10
20
30
Body temperature (°C)
28
30
32
34
33 °C
23 °C
ON
OFF
ON
OFF
1 cm

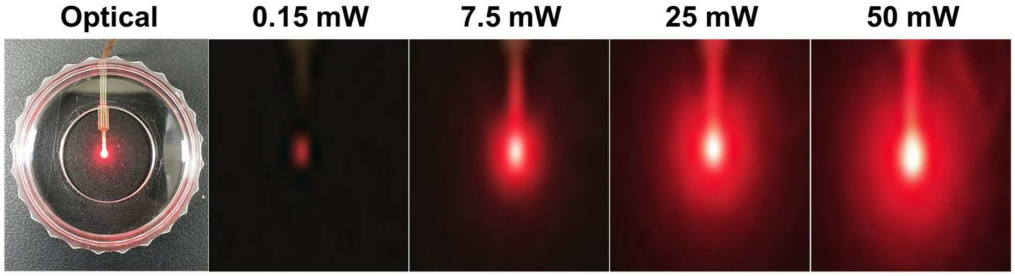
도면10



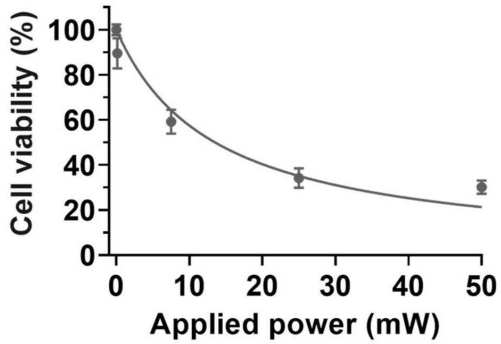
도면11



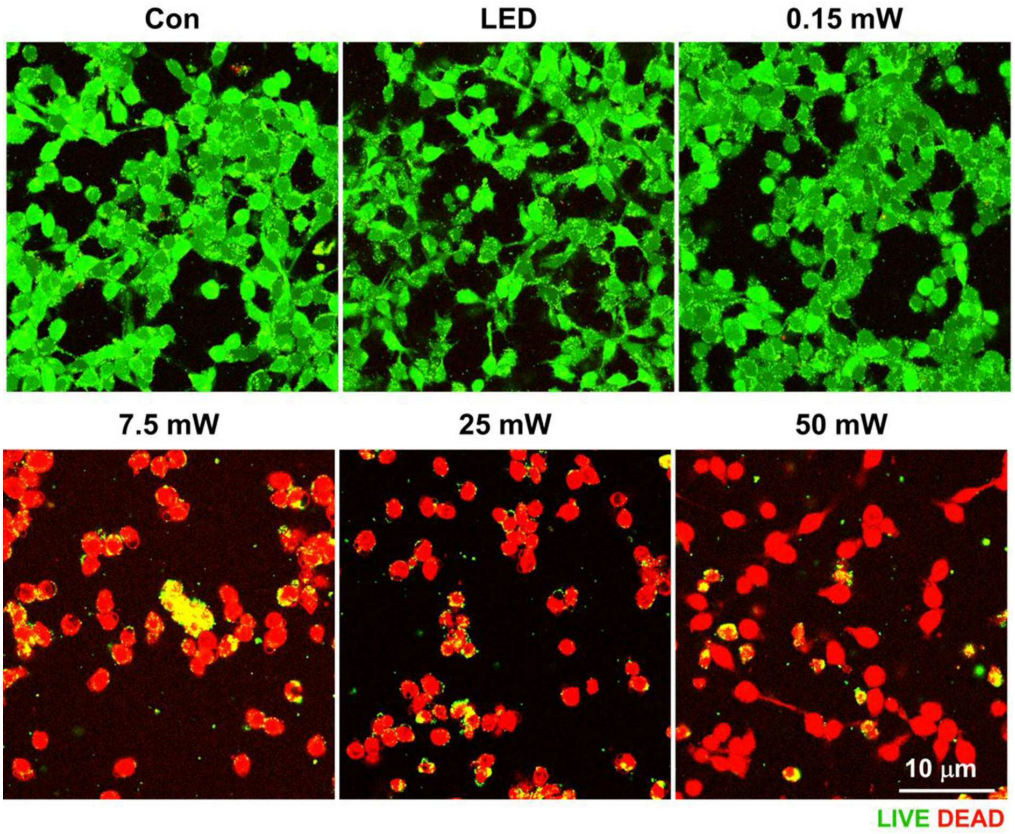
도면12



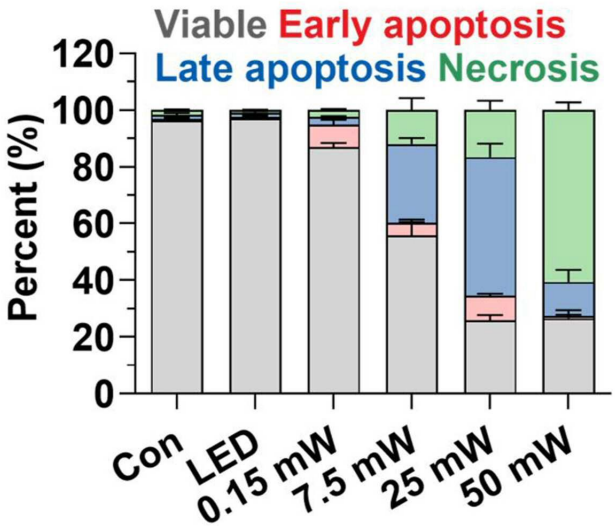
도면13


Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
Applied power (mW)

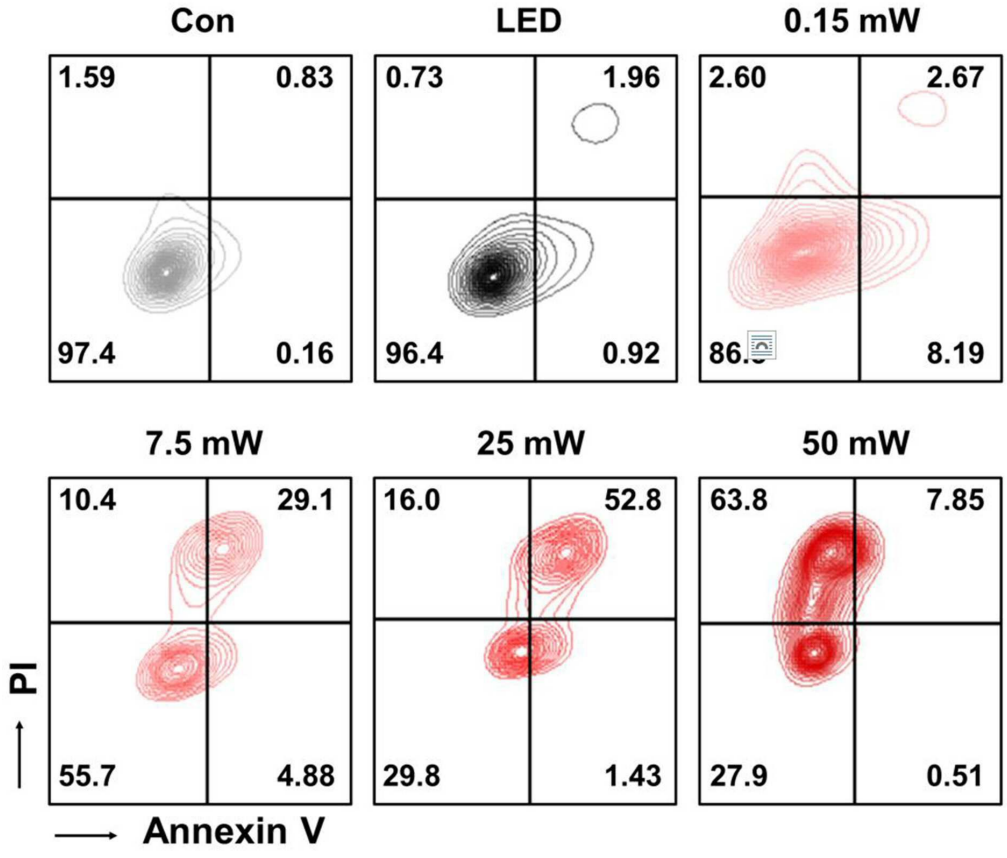
도면14


Con
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
10 μm
LIVE DEAD

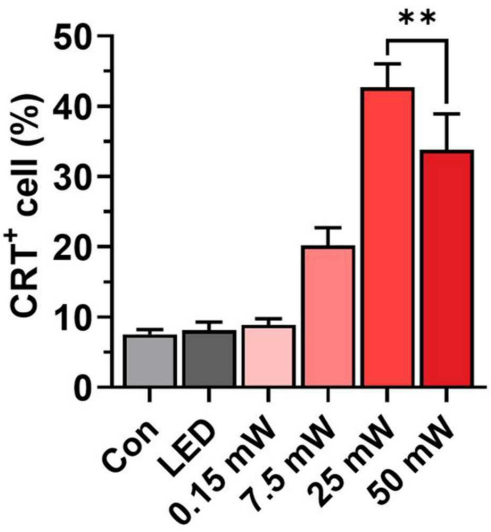
도면15


Viable Early apoptosis
Late apoptosis Necrosis
Percent (%)
120
100
80
60
40
20
0
Con
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW

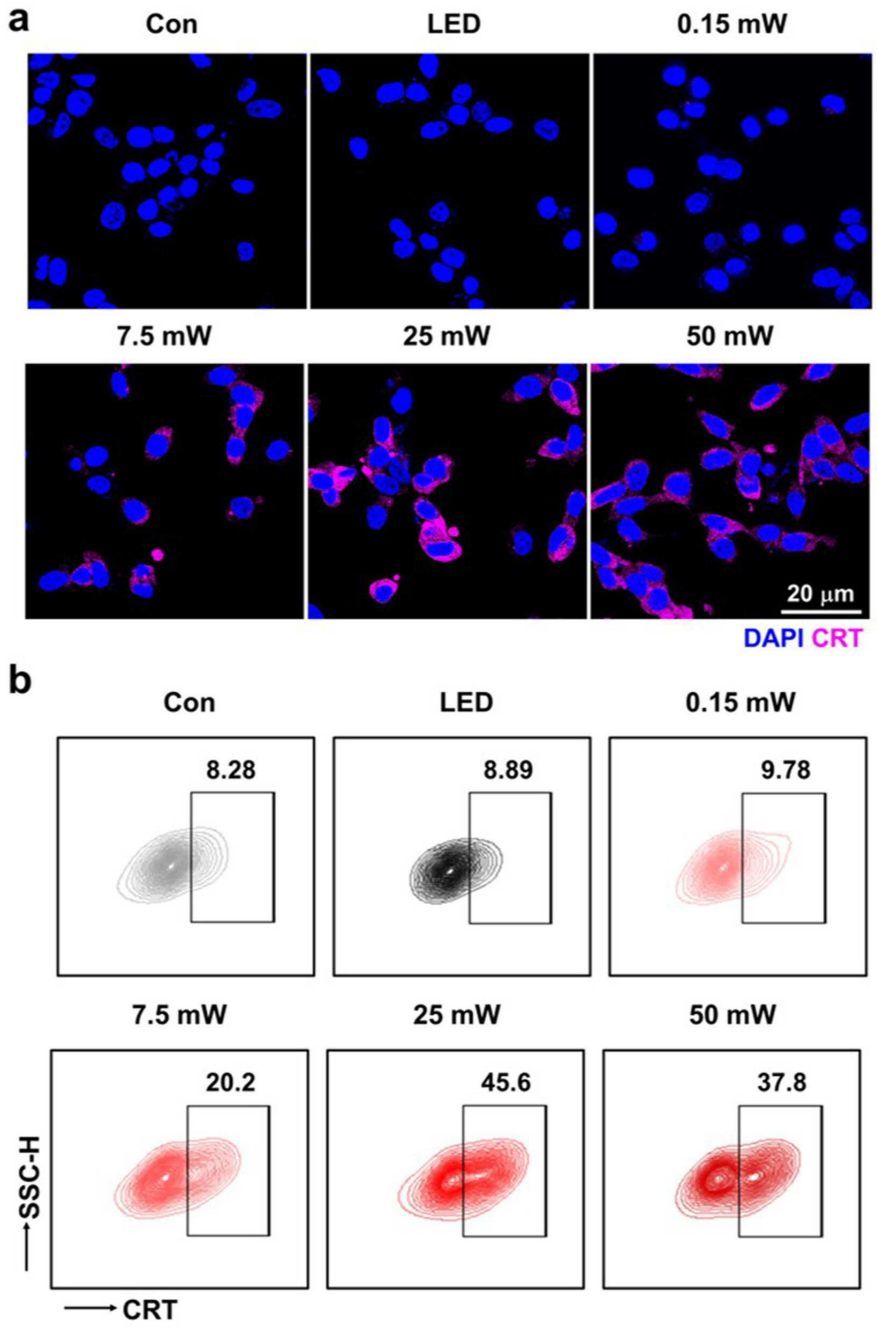
도면16


Con
LED
0.15 mW
1.59
0.83
97.4
0.16
0.73
1.96
96.4
0.92
2.60
2.67
8.19
7.5 mW
25 mW
50 mW
10.4
29.1
55.7
4.88
16.0
52.8
29.8
1.43
63.8
7.85
27.9
0.51
PI
Annexin V

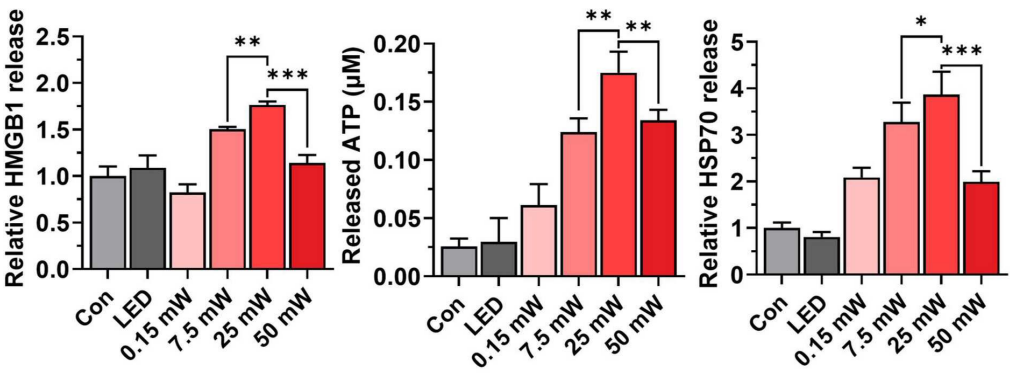
도면17



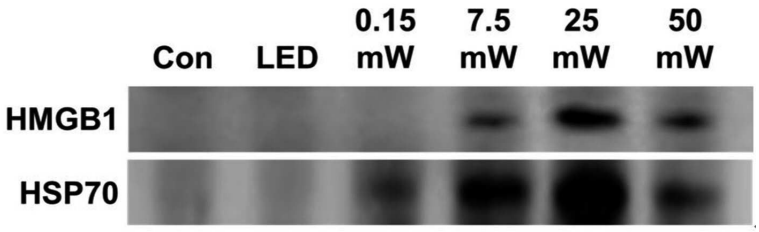
도면18


a
Con
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
20 μm
DAPI CRT
b
Con
LED
0.15 mW
8.28
8.89
9.78
7.5 mW
25 mW
50 mW
20.2
45.6
37.8
SSC-H
CRT

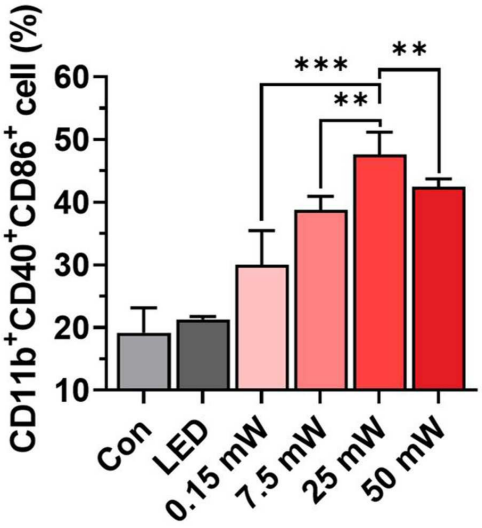
도면19


Relative HMGB1 release
Released ATP (μM)
Relative HSP70 release
Con
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW

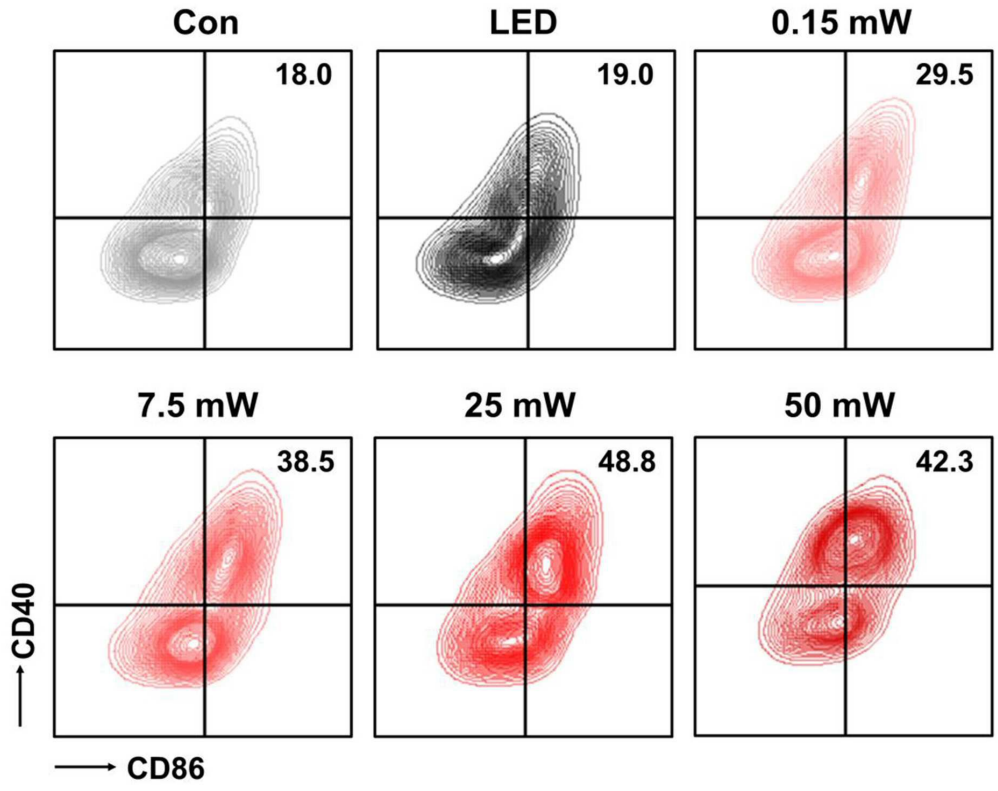
도면20



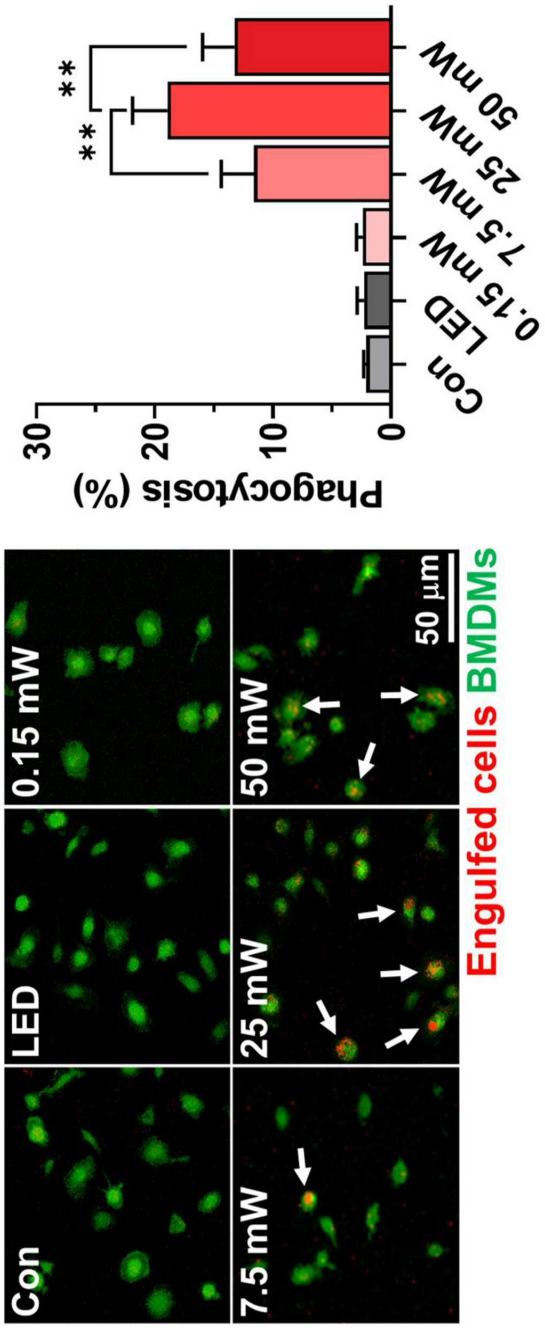
도면21



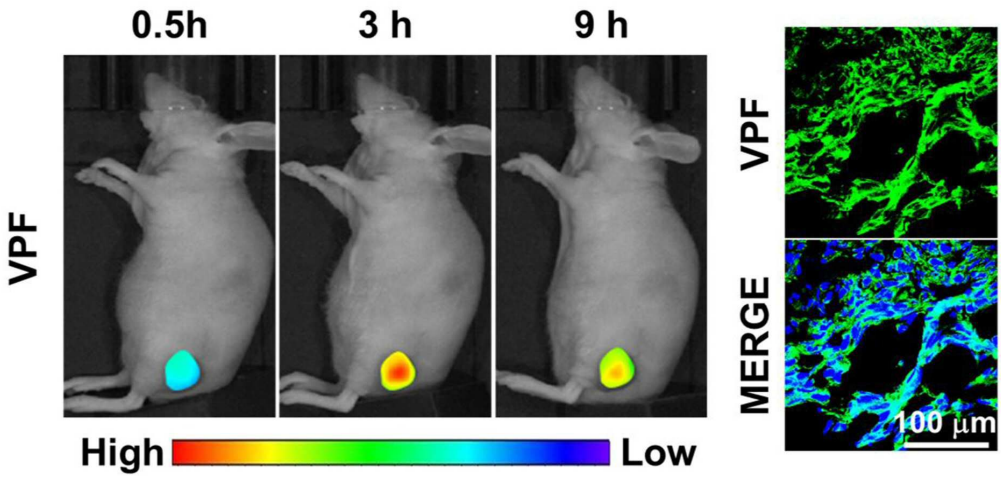
도면22



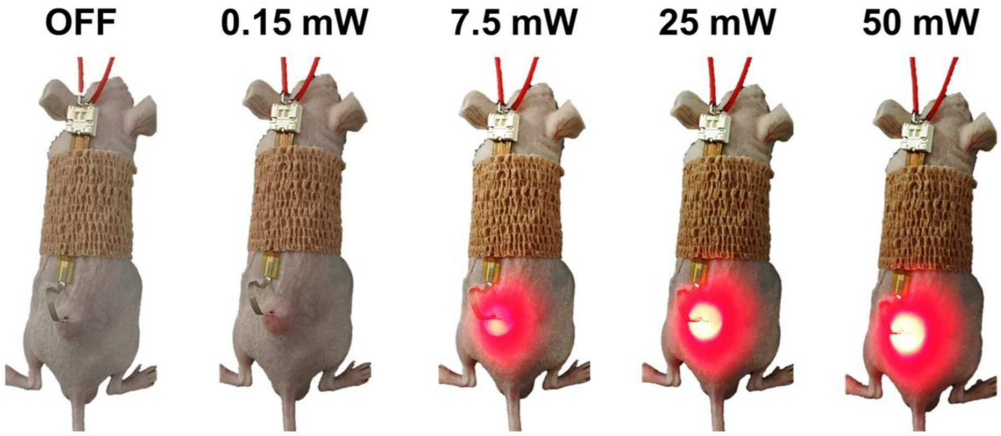
도면23


Phagocytosis (%)
0
10
20
30
Con
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
**
**
Con
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
50 μm
Engulfed cells BMDMs

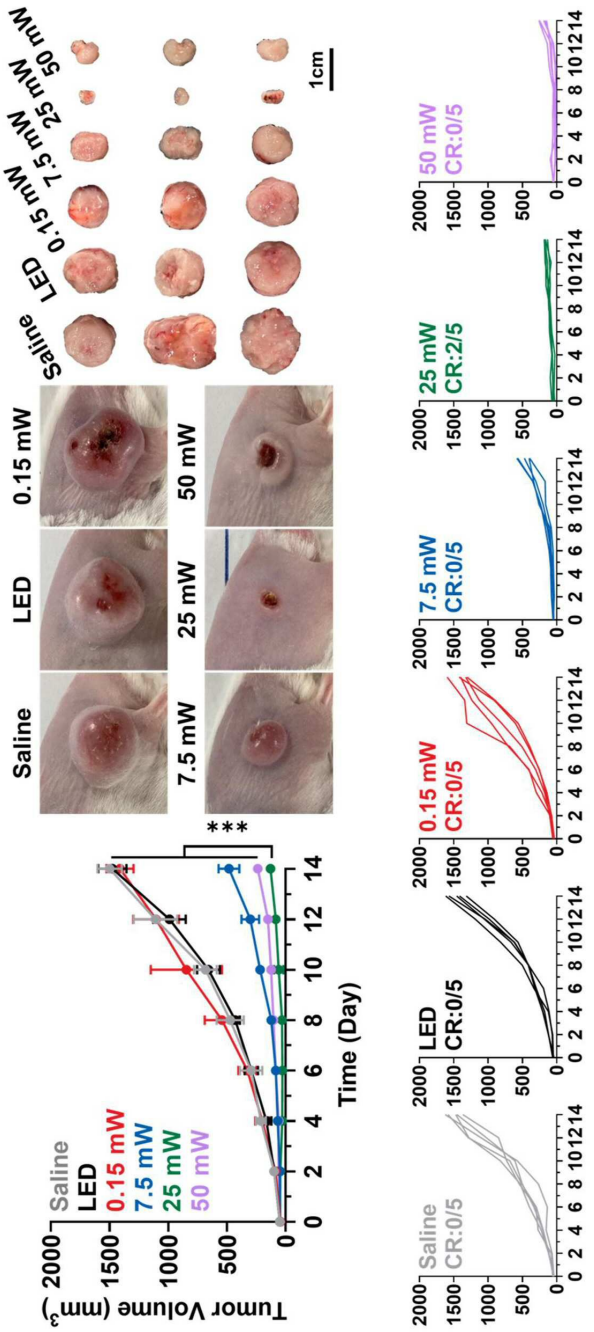
도면24


0.5h
3 h
9 h
VPF
VPF
MERGE
100 μm
High
Low

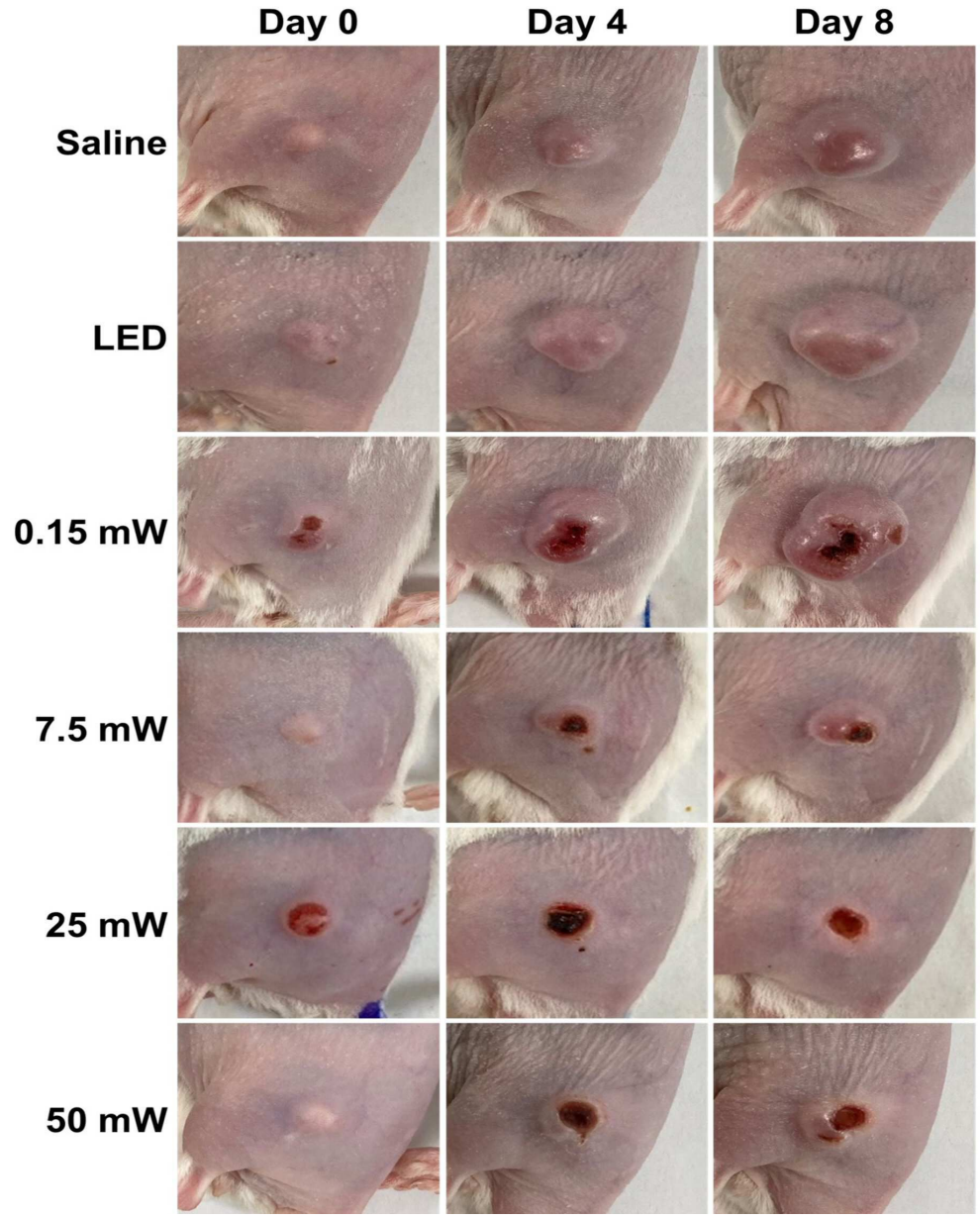
도면25


OFF
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW

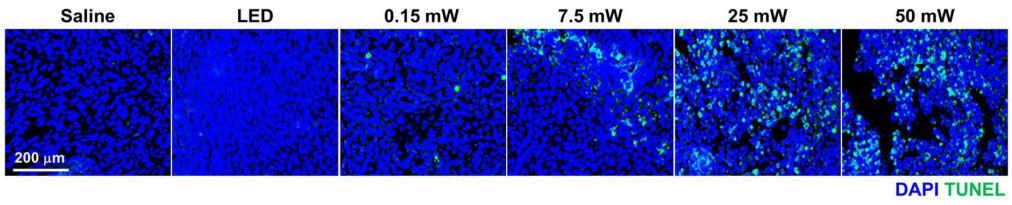
도면26


Saline
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
1cm
***
Tumor Volume (mm³)
Time (Day)
CR:0/5
CR:2/5

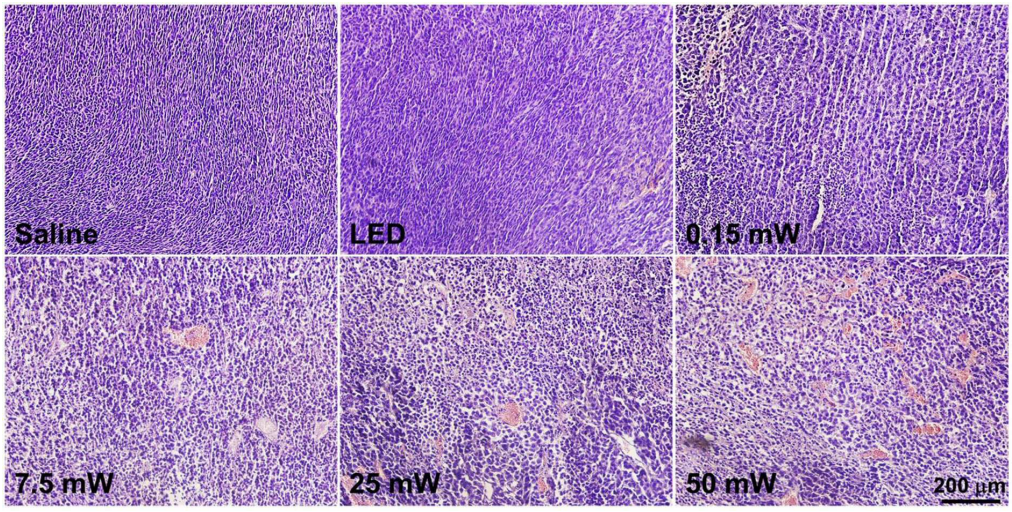
도면27


Day 0
Day 4
Day 8
Saline
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW

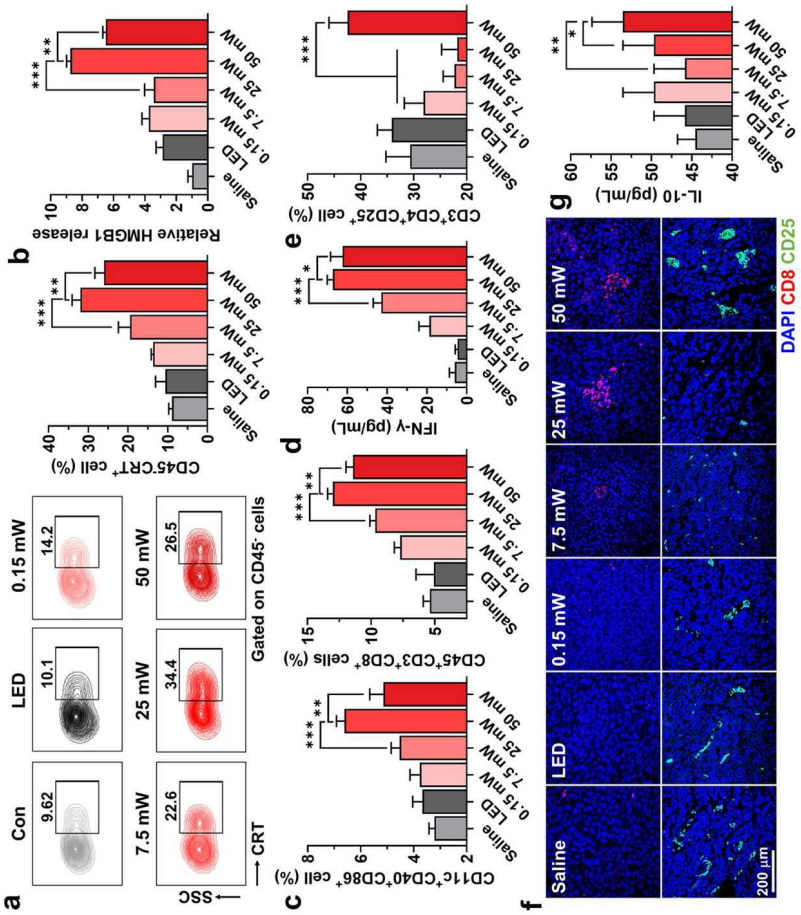
도면28


Saline
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
200 μm
DAPI TUNEL

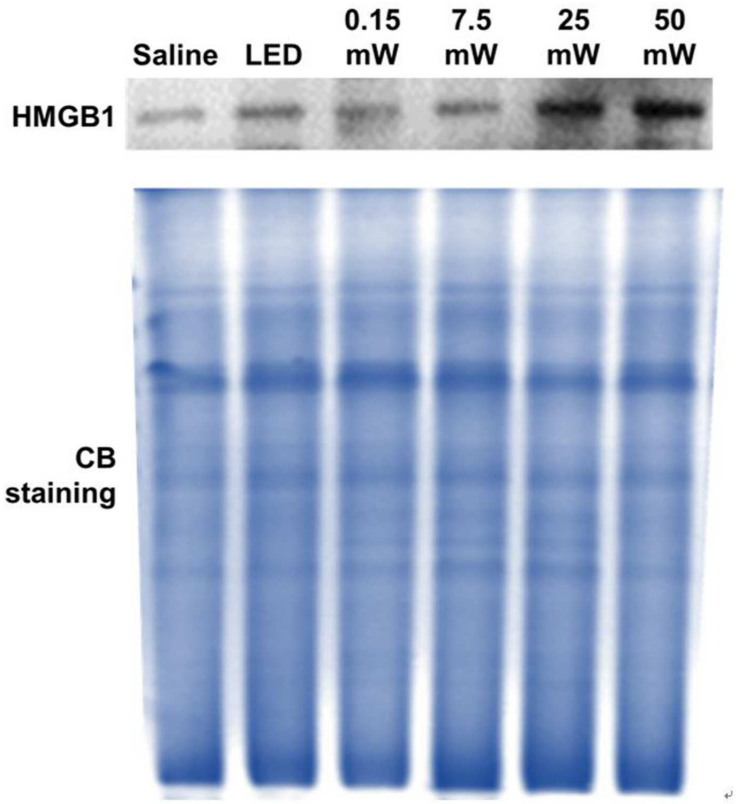
도면29


Saline
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
200 μm

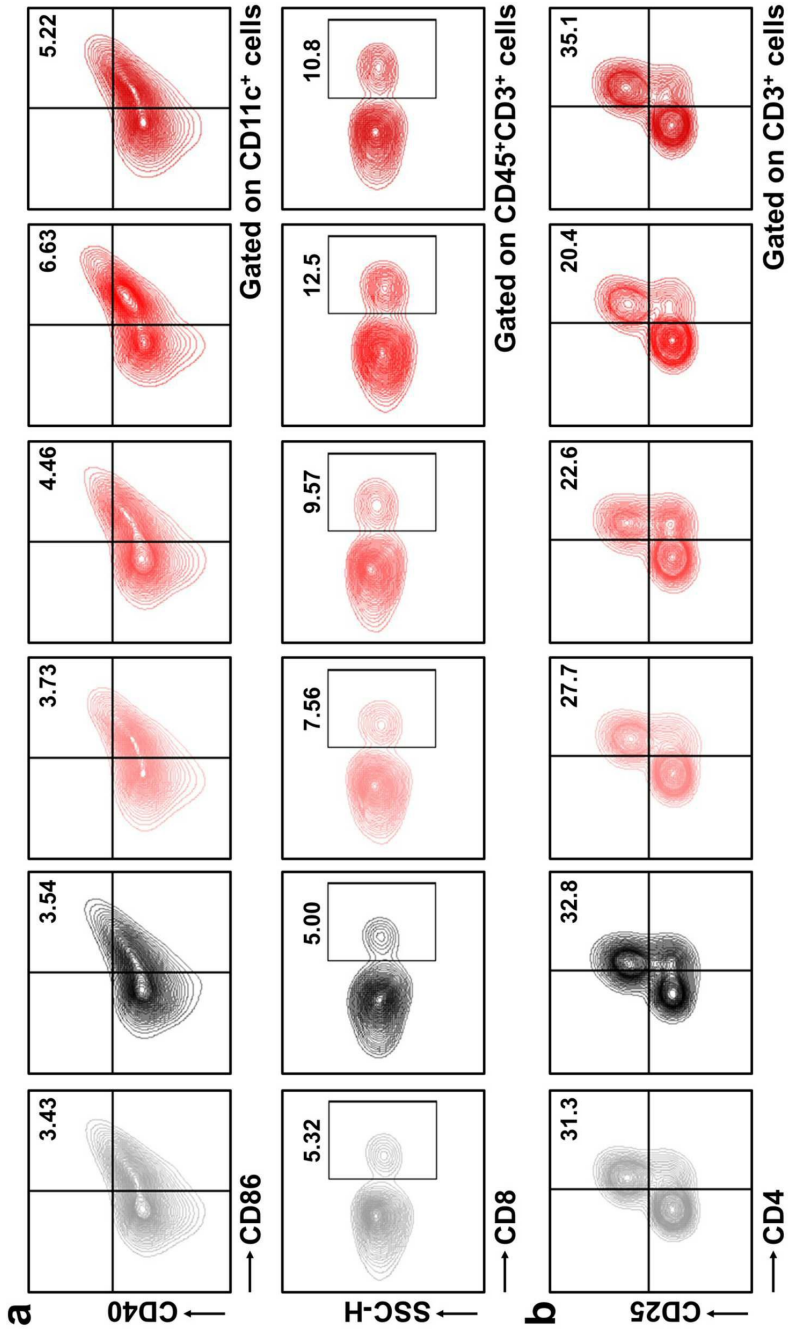
도면30


a
Con
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
9.62
10.1
14.2
22.6
34.4
26.5
SSC
CRT
Gated on CD45⁻ cells
b
CD45⁺CRT⁺ cell (%)
Relative HMGB1 release
c
CD11c⁺CD40⁺CD86⁺ cell (%)
d
CD45⁺CD3⁺CD8⁺ cells (%)
e
IFN-γ (pg/mL)
CD3⁺CD4⁺CD25⁺ cell (%)
f
Saline
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW
DAPI CD8 CD25
200 μm
g
IL-10 (pg/mL)
Saline
LED
0.15 mW
7.5 mW
25 mW
50 mW

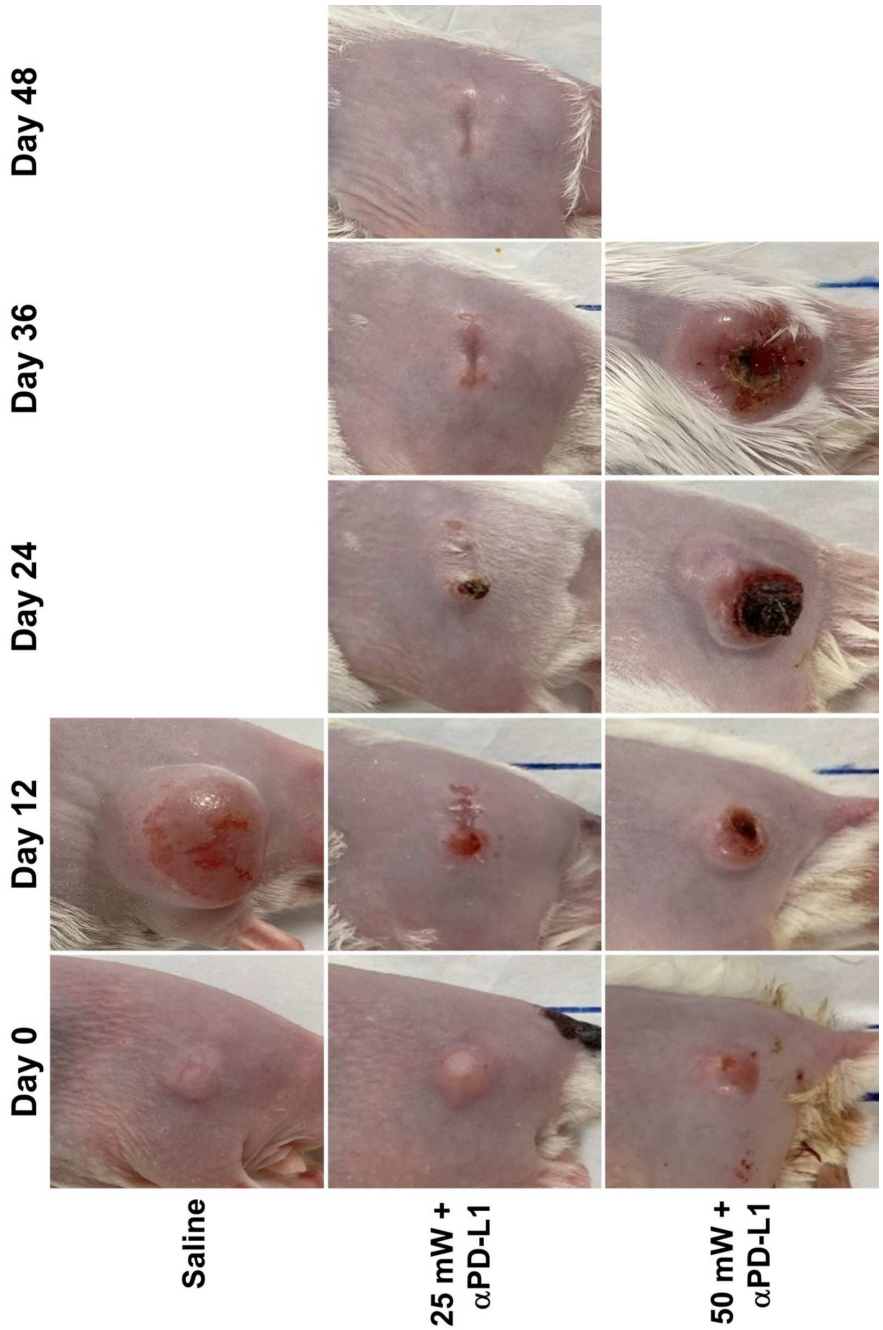
도면31



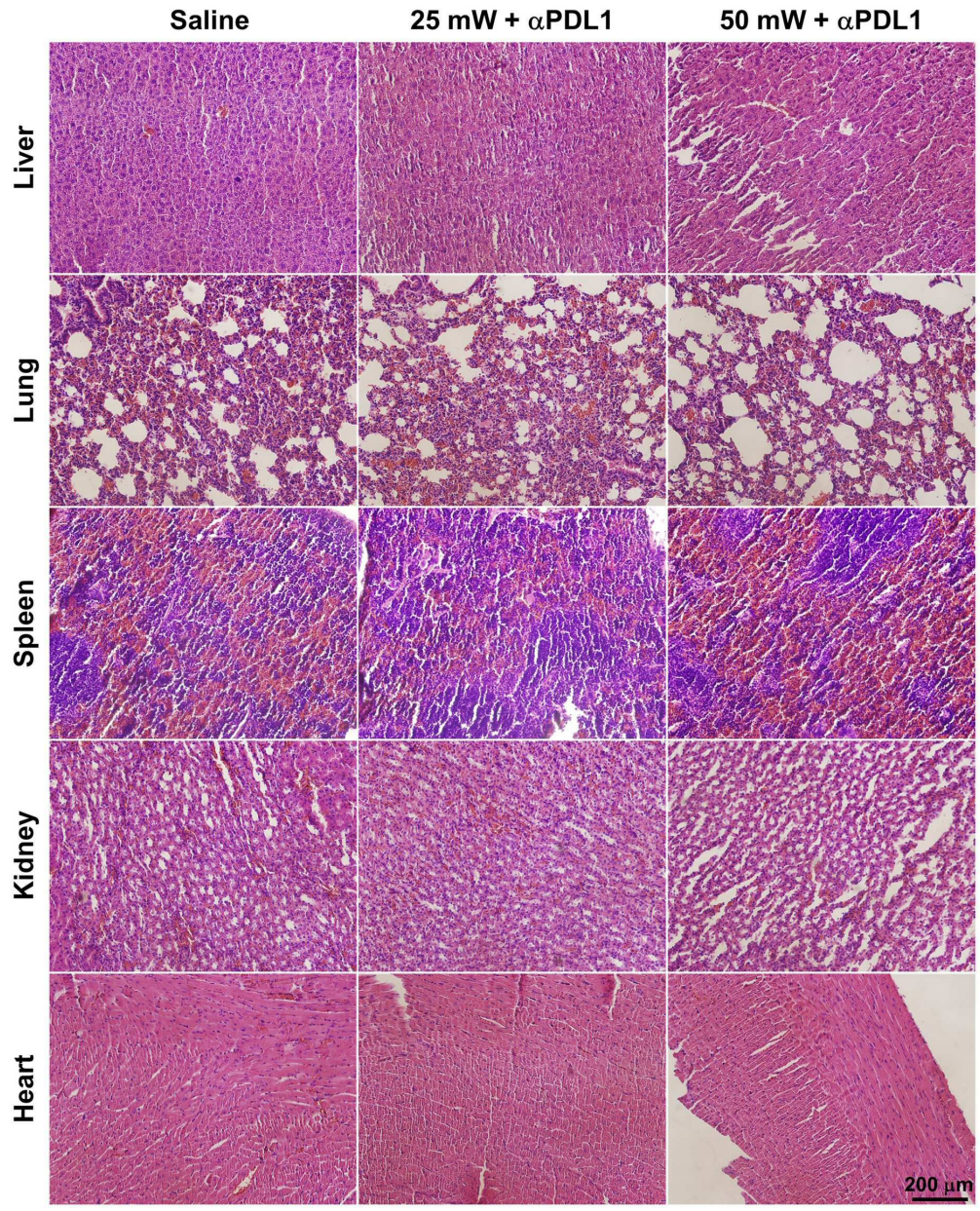
도면32


a
CD40
CD86
3.43
3.54
3.73
4.46
6.63
5.22
Gated on CD11c+ cells
SSC-H
CD8
5.32
5.00
7.56
9.57
12.5
10.8
Gated on CD45+CD3+ cells
b
CD25
CD4
31.3
32.8
27.7
22.6
20.4
35.1
Gated on CD3+ cells

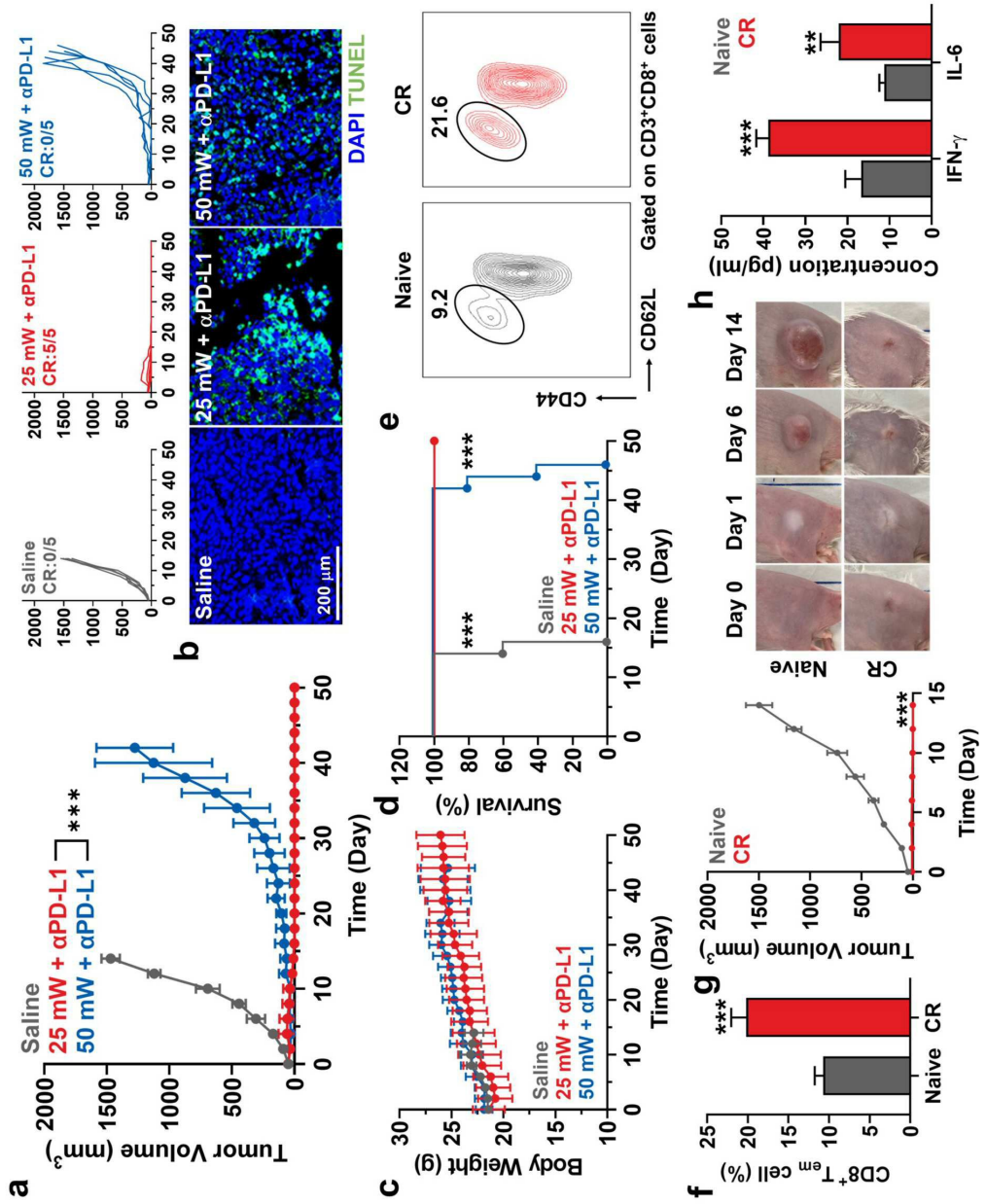
도면33



도면34


Saline
25 mW + αPDL1
50 mW + αPDL1
Liver
Lung
Spleen
Kidney
Heart
200 μm

도면35


a
Tumor Volume (mm³)
Saline
25 mW + αPD-L1
50 mW + αPD-L1
***
Time (Day)
b
Saline CR:0/5
25 mW + αPD-L1 CR:5/5
50 mW + αPD-L1 CR:0/5
Saline
25 mW + αPD-L1
50 mW + αPD-L1
200 μm
DAPI TUNEL
c
Body Weight (g)
Saline
25 mW + αPD-L1
50 mW + αPD-L1
Time (Day)
d
Survival (%)
***
***
Saline
25 mW + αPD-L1
50 mW + αPD-L1
Time (Day)
e
Naive
9.2
CR
21.6
CD44
CD62L
Gated on CD3+CD8+ cells
f
CD8+ Tem cell (%)
***
Naive
CR
g
Tumor Volume (mm³)
Naive
CR
***
Time (Day)
h
Day 0
Day 1
Day 6
Day 14
Naive
CR
Concentration (pg/ml)
***
**
IFN-γ
IL-6
Naive
CR